

Institut für Ernährungswissenschaft  
und III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Justus-Liebig-Universität Gießen

# Der Einfluss der antioxidativen Vitamine E und C auf die diabetische Nephropathie

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
im Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotoxikologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Christian Varendorff

Gießen 2003

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>4</b>
2.1. Der Sauerstoff.....	4
2.1.1. Singulett-Sauerstoff.....	5
2.1.2. Superoxidanion.....	5
2.1.3. Wasserstoffperoxid.....	5
2.1.4. Hydroxidradikal.....	6
2.1.5. Peroxidradikal.....	6
2.2. Die Lipidperoxidation als Beispiel für eine radikalische Reaktion.....	6
2.2.1. Der Mechanismus der Lipidperoxidation.....	6
2.2.2. Physiologische Bedeutung der Radikale am Beispiel des Arachidonsäuremetabolismus.....	7
2.3. Weitere Radikalquellen (Prooxidantien).....	8
2.4. Antioxidative Mechanismen.....	9
2.4.1. Niedermolekulare Substanzen.....	10
2.4.1.1. Die antioxidativen Vitamine.....	10
2.4.1.1.1. Ascorbinsäure.....	10
2.4.1.1.1.1. Strukturformel.....	10
2.4.1.1.1.2. Funktion.....	10
2.4.1.1.1.3. Pharmakologie und Toxikologie.....	11
2.4.1.1.2. Die Tokopherole.....	12
2.4.1.1.2.1. Strukturformel.....	12
2.4.1.1.2.2. Funktion.....	13
2.4.1.1.2.3. Pharmakologie und Toxikologie.....	14
2.4.1.2. Sonstige niedermolekulare Antioxidantien.....	15

2.4.1.2.1.	Funktion der Harnsäure.....	15
2.4.2.	Die enzymatischen Systeme.....	16
2.4.2.1.	Die Katalase.....	16
2.4.2.2.	Die Superoxiddismutase.....	16
2.4.2.3.	Die Glutathionperoxidase und Glutathion-S-Transferase.....	17
2.4.2.3.1.	Die Strukturformel.....	17
2.4.2.3.2.	Funktion.....	17
2.4.3.	Reparatursysteme.....	18
2.4.4.	Synergismus antioxidativer Systeme (Rekonstitutionssysteme).....	19
2.5.	Krankheitsbilder mit Radikalbeteiligung.....	20
2.6.	Oxidativer Stress bei Diabetes mellitus und sein Einfluss auf die diabetischen Folgeschäden.....	22
2.6.1.	Erhöhter oxidativer Stress bei Diabetikern.....	22
2.6.2.	Erhöhte Prooxidantien.....	25
2.6.2.1.	Glukose als Radikalbildner.....	25
2.6.2.2.	Die nichtenzymatische Glykosylierung als Radikalbildner.....	28
2.6.3.	Erniedrigte Antioxidantien.....	30
2.7.	Die diabetischen Folgeschäden.....	32
2.7.1.	Die diabetische Makroangiopathie.....	32
2.7.2.	Die diabetische Mikroangiopathie.....	33
2.7.3.	Die diabetische Retinopathie/Katarakt.....	34
2.7.4.	Die diabetische Neuropathie.....	35
2.7.5.	Die diabetische Nephropathie.....	35
2.8.	Einflussfaktoren auf das Fortschreiten der diabetischen Folge- schäden, unter besonderer Berücksichtigung der Nephropathie.....	38
2.8.1.	Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen eines hohen Blutglukosespiegels.....	38
2.8.2.	Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der Proteinzufuhr.....	40

2.8.3.	Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen des Blutdruckes.....	41
2.8.4.	Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der körperlichen Aktivität.....	42
2.8.5.	Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der Gravidität.....	42
2.8.6.	Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der atherosklerotischen Veränderungen.....	42
2.9.	Studien, die einen Hinweis auf den Einfluss von Radikalen oder Antioxidantien auf die diabetischen Folgeschäden geben.....	43
2.9.1.	Der Einfluss von Radikalen.....	43
2.9.2.	Der Einfluss von Antioxidantien.....	45
2.9.2.1.	Das Glutathion.....	45
2.9.2.2.	Das Vitamin E.....	46
2.9.2.2.1.	Der Einfluss auf die nichtenzymatischen Glykierungsprozesse.....	46
2.9.2.2.2.	Der Einfluss auf die Angiopathie.....	48
2.9.2.2.3.	Der Einfluss auf die Nephropathie.....	50
2.9.2.3.	Das Vitamin C.....	51
2.9.2.3.1.	Der Einfluss auf die nichtenzymatischen Glykierungsprozesse.....	51
2.9.2.3.2.	Der Einfluss auf die Nephropathie.....	52
2.9.2.3.3.	Der Einfluss auf die Retinopathie.....	52
2.9.2.3.4.	Der Einfluss auf den Lipidstoffwechsel.....	53
2.10.	Die Proteinkinase-C-Familie.....	53

<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>56</b>
3.1.	Patientenkollektiv.....	56
3.2.	Versuchsaufbau.....	57
3.3.	Untersuchte Proben.....	58
3.4.	Albumin.....	59
3.4.1.	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....	59
3.4.2.	Reagenzien.....	59
3.4.3.	Vorbereitung.....	60
3.4.4.	Durchführung der Albuminbestimmung.....	60
3.5.	Fruktosamin.....	62
3.5.1.	Reagenzien.....	62
3.5.2.	Probenmaterial.....	63
3.5.3.	Durchführung der Bestimmung.....	64
3.6.	HbA <sub>1c</sub> .....	65
3.6.1.	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....	65
3.6.2.	Reagenzien.....	65
3.6.3.	Vorbereitung.....	66
3.6.3.1.	Herstellen des HbA <sub>1c</sub> -Referenzstandards.....	66
3.6.3.2.	Herstellen der Kontrollen.....	66
3.6.4.	Durchführung des Tests.....	67
3.7.	Hb-AGE.....	68
3.7.1.	Isolierung der Erythrozyten aus frischem Vollblut.....	68
3.7.2.	Präparierung des Hämolysates von gefrorenen und gepackten Erythrozyten.....	69
3.7.3.	Präparierung des Hämoglobins für den Assay.....	69
3.7.4.	Präparierung der AGE-BSA-Platten.....	70
3.7.4.1.	Coatingpuffer (0,1 M NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6, 0,02% NaN <sub>3</sub> ).....	70
3.7.4.2.	AGE-Assay-Anleitung.....	71
3.7.4.3.	Mikrotiterplattenbefüllung.....	72
3.7.5.	Die Lösungen.....	72

3.7.5.1.	Coatingpuffer.....	72
3.7.5.2.	Blocking-Puffer.....	73
3.7.5.3.	Verdünnungspuffer.....	73
3.7.5.4.	Substratpuffer (entweder Puffer A mit Substrat A oder Puffer B mit Substrat B).....	73
3.7.5.5.	PNPP-Substrat.....	74
3.7.5.6.	1° Antikörper (Kaninchen Anti-AGE-Rnase).....	74
3.7.5.7.	2° Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen-IgG, Cappel # 59298).....	74
3.7.5.8.	Waschpuffer.....	74
3.7.5.9.	0,3 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer, pH 4,0.....	75
3.7.5.10.	CMF-PBS-Puffer, pH 7,4.....	75
3.7.6.	Gesamtprotein (Lowry-Methode).....	75
3.7.6.1.	Durchführung.....	75
3.7.6.2.	Standards.....	76
3.7.6.3.	Lösungen.....	76
3.7.6.3.1.	Lowry-Reagenz (pH 12,8).....	76
3.7.6.3.2.	Folin & Ciocalteu's-Phenolreagenz.....	77
3.8.	Cholesterin.....	78
3.9.	HDL-Cholesterin.....	79
3.10.	Triglyzeride.....	80
3.11.	Vitamin E.....	81
3.11.1.	Lagerung der Proben.....	81
3.11.2.	Durchführung.....	81
3.11.3.	Material und Geräte.....	81
3.12.	Vitamin C.....	82
3.12.1.	Lagerung der Proben.....	82
3.12.1.1.	Probenaufbereitung.....	82
3.12.2.	Durchführung.....	82
3.12.3.	Material und Geräte.....	83
3.13.	Malondialdehyd.....	84

3.13.1.	Natriumazetatpuffer (20 g/l) mit einem pH von 3,50.....	84
3.13.2.	Thiobarbitursäurelösung (2 g/l).....	84
3.13.3.	2,6-Di-tert-Butyl-4-Methylphenollösung (50 g/l).....	84
3.13.4.	MDA-Standardlösungen.....	85
3.13.5.	Die Umsetzung mit TBA.....	85
3.13.6.	Die HPLC-Analyse.....	86
3.14.	Statistik.....	88
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>89</b>
4.1.	Die Messergebnisse der Gruppe A.....	90
4.1.1.	Die Albuminausscheidung der Einzelmesszeitpunkte.....	90
4.1.2.	Die gemittelte Albuminausscheidung.....	91
4.1.3.	Die prozentuale Änderung der Albuminausscheidung.....	92
4.1.4.	Die Fruktosaminspiegel der Einzelmesszeitpunkte.....	93
4.1.5.	Die gemittelten Fruktosaminspiegel.....	94
4.1.6.	Die HbA <sub>1c</sub> -Werte der Einzelmesszeitpunkte.....	95
4.1.7.	Die gemittelten HbA <sub>1c</sub> -Werte.....	96
4.1.8.	Die prozentuale Änderung der HbA <sub>1c</sub> -Werte.....	97
4.1.9.	Die Hb-AGE-Werte der Einzelmesszeitpunkte.....	98
4.1.10.	Die gemittelten Hb-AGE-Spiegel.....	99
4.1.11.	Die prozentuale Änderung der Hb-AGE-Werte.....	100
4.1.12.	Die Blutdruckwerte der Einzelmesszeitpunkte.....	101
4.1.13.	Die gemittelten Blutdruckwerte.....	102
4.2.	Die Messergebnisse der Gruppe B.....	103
4.2.1.	Die Albuminausscheidung der Einzelmesszeitpunkte.....	103
4.2.2.	Die gemittelte Albuminausscheidung.....	104
4.2.3.	Die prozentuale Änderung der gemittelten Albuminausscheidung.....	105
4.2.4.	Die Fruktosaminspiegel der Einzelmesspunkte.....	106

4.2.5.	Die gemittelten Fruktosaminspiegel.....	107
4.2.6.	Die HbA <sub>1c</sub> -Werte der Einzelmesszeitpunkte.....	108
4.2.7.	Die gemittelten HbA <sub>1c</sub> -Werte.....	109
4.2.8.	Die prozentuale Änderung der gemittelten HbA <sub>1c</sub> -Werte.....	110
4.2.9.	Die Blutdruckwerte der Einzelmesszeitpunkte.....	111
4.2.10.	Die gemittelten Blutdruckwerte.....	112
4.3.	Die Messergebnisse der Gruppe C.....	113
4.3.1.	Die Albuminausscheidung der Einzelmesszeitpunkte.....	113
4.3.2.	Die gemittelte Albuminausscheidung.....	114
4.3.3.	Die prozentuale Änderung der Albuminausscheidung.....	115
4.4.	Die anderen Messwerte.....	116
4.4.1.	Der Cholesterinspiegel.....	116
4.4.2.	Der Triglyzeridspiegel.....	117
4.4.3.	Der HDL-Cholesterinspiegel.....	118
4.4.4.	Der Vitamin-C-Spiegel.....	119
4.4.5.	Der Vitamin-E-Spiegel.....	120
4.4.6.	Die Blutglukose.....	121
4.4.7.	Die MDA-Konzentration der Einzelmesswerte der Gruppe B.....	122
4.4.8.	Die gemittelte MDA-Konzentration der Gruppe B.....	123
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>124</b>
5.1.	Statistische Probleme.....	124
5.2.	Vorzeitige Studienabbrüche.....	125
5.3.	Grundlage der Studie.....	125
5.4.	Andere Einflussfaktoren auf die diabetische Nephropathie.....	128
5.4.1.	Der Einfluss der sportlichen Aktivität.....	129
5.4.2.	Der Einfluss der Proteinzufuhr.....	129



5.4.3.	Der Einfluss des Blutdruckes.....	130
5.4.4.	Der Einfluss der Blutglukose.....	132
5.5.	Vergleich des Blutglukosespiegels mit der Höhe des HbA <sub>1c</sub> -Wertes.....	133
5.6.	Einfluss der antioxidativen Vitamine auf Parameter der nichtenzymatischen Glykosylierung.....	134
5.6.1.	Einfluss auf das Fruktosamin.....	136
5.6.2.	Einfluss auf das HbA <sub>1c</sub> .....	136
5.6.3.	Einfluss auf die Hb-AGE.....	140
5.6.4.	Einfluss auf die Albuminausscheidung.....	141
5.7.	Zukunftsperspektive.....	145
 <b>6. Zusammenfassung</b>		 <b>147</b>
 <b>7. Literaturverzeichnis</b>		 <b>149</b>
 <b>Danksagung</b>		 <b>168</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
al.	alea
ACE	Angiotensin converting enzyme
AGE	Advanced glycosylated endproducts
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
Bz	Blutzucker, Blutglukose
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
d	Tag
DAG	Diazylglyzerol
DCCT	The diabetes control and complication trial
DEA	Diethanolamin
dest.	destilliert
DHA	Dehydroaskorbat
DHF	Dihydroxyfumarsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
Fe	Ferrum; Eisen
FMNH <sub>2</sub>	Flavinmononukleotid (reduzierte Form)
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GHb	glykosyliertes Hämoglobin

GSH	Glutathion
h	Stunde/n
HbA <sub>1c</sub>	Hämoglobin A Fraktion 1c
Hb-AGE	Hemoglobin advanced glycosylated endproducts
HCl	Salzsäure
HDL	High density lipoprotein
Hg	Quecksilber
HPLC	High pressure liquid chromatography
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin 1
Inj.	Injektionen
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
K	Kalium
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzerkrankung
l	Liter
LDL	Low density lipoprotein
M	Molar
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
N	Normale

Na	Natrium
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickoxid
Nr.	Nummer
n. s.	nicht signifikant
oLDL	oxidiertes LDL
p	Signifikanzniveau
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PKC	Proteinkinase-C
PX	Peroxidase
RPF	renaler Plasmafluss
RR	Riva Rochi; Blutdruck
s. o.	siehe oben
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
Tbl.	Tablette
TG	Triglyzeride
TGF-beta	Transforming growth factor beta
TMP	Malonaldehyd-bis-Methylazetal
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Total-trapping-antioxidant-parameter
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
UKPDS 38	United kingdom prospective diabetes study
µl	Mikroliter
u. a.	unter anderem

U/min	Umdrehungen pro Minute
U/mg	Units pro Milligramm
VLDL	Very low density lipoprotein
z. B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

In Deutschland sind zur Zeit 5% der Bevölkerung oder etwa 4 Millionen Einwohner an Diabetes mellitus erkrankt. Trotz vielfältiger Therapieoptionen ist die durchschnittliche Lebenserwartung um 30% reduziert.

Mittlerweile führen akute Komplikationen (Hyperglykämie, diabetisches Koma) nur noch selten zum Tode. Stattdessen können für 75% der Todesfälle die Folgen der Makroangiopathie verantwortlich gemacht werden.

Die diabetischen Folgeschäden sind zum einen spezifisch (Mikroangiopathie) und zum anderen unspezifisch (Makroangiopathie) (Rösen et al., 1991; Rösen, 1994).

Etwa 90% der direkten und indirekten Kosten für die Behandlung der diabetischen Patienten gehen auf das Konto der Folgeschäden (Parving, 1998). Wichtigstes Ziel bei der Vermeidung von Folgeschäden ist die Verhinderung der Hyperglykämie und damit ein möglichst niedriger Hämoglobin-A<sub>1c</sub>-Wert (HbA<sub>1c</sub>-Wert). Dadurch lässt sich das Risiko, an Folgeschäden zu erkranken, erheblich reduzieren. Ohkubo fand bei einem Vergleich von intensivierter Insulintherapie mit 4 Injektionen pro Tag (4 Inj./d) mit konventioneller (1 - 2 Inj./d), dass in einem Beobachtungszeitraum von 6 Jahren und einem HbA<sub>1c</sub>-Wert kleiner als 6,5% keine weitere Verschlechterung der Retinopathie auftrat. Ebenso nahm das Retinopathie- und Nephropathierisiko um etwa 70% ab (Ohkubo et al., 1995).

Die diabetes-control-and-complications-trial-Studie (DCCT-Studie) bestätigte den Einfluss der Stoffwechselkontrolle auf die Folgeschäden bei Typ-1-Diabetikern. Das Fortschreiten beziehungsweise (bzw.) das Auftreten von diabetischen Folgeschäden wurde bei einer konventionellen Therapie (1 - 2 Inj./d) im Vergleich zur intensivierten (Pumpe od. > 3 Inj./d + Blutzuckerkontrolle) untersucht. Durch die intensivierte Therapie sank der HbA<sub>1c</sub>-Wert innerhalb von 6 Monaten um durchschnittlich 2%. Nach einem Zeitraum von 6,5 Jahren wurden folgende Befunde zugunsten der intensivierten Therapie beobachtet:

1. Risikoreduktion einer Retinopathieentstehung um 76%
2. Risikoreduktion des Fortschreitens einer leichten Retinopathie um 54%
3. Risikoreduktion der Entstehung einer proliferativen oder schweren nicht proliferativen Retinopathie um 47%

4. Risikoreduktion des Auftretens einer Mikroalbuminurie um 39% und einer Makroalbuminurie um 54%
5. Risikoreduktion des Entstehens einer klinischen Neuropathie um 60% (Ohne Autor, 1993).

Die united kingdom prospective diabetes study (UKPDS 38) belegte die Bedeutung des Blutdruckes als Risikofaktor für die Entstehung der diabetischen Folgeschäden. In dieser Studie wurde der Verlauf von Folgeschäden zwischen einer aggressiv eingestellten Gruppe – mit einem Blutdruck < 150/85 Millimeter Quecksilbersäule - und einer weniger aggressiv behandelten Gruppe (RR < 180/105 mmHg) im Verlauf von 9 Jahren miteinander verglichen. Der anfängliche durchschnittliche Blutdruck von 160/94 mmHg sank in der aggressiv eingestellten Gruppe auf 144/82 mmHg und in der weniger aggressiv behandelten auf 154/87 mmHg. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Es wurden die folgenden Befunde erhoben:

1. Das Risiko mikrovaskulärer Schäden sank um 37%.
2. Das Risiko eine Mikroalbuminurie zu entwickeln, verringerte sich nach 3 Jahren um 23%, nach 6 Jahren signifikant um 29% und nach 9 Jahren um 13%.
3. Das Risiko eine Makroalbuminurie zu entwickeln, sank nach 3 Jahren um 43%, nach 6 Jahren um 39% und stieg nach 9 Jahren um 6% (Turner et al., 1998).

Als weiterer Faktor für die Entstehung von diabetischen Folgeerkrankungen wird die erhöhte Radikalenproduktion diskutiert.

Das Leben besteht aus einer Vielzahl von oxidativen und reduktiven biochemischen Reaktionen in Zellkompartimenten. Bei diesen Reaktionen entstehen Radikale als hochreaktive, kurzlebige Zwischenprodukte. Dabei kommt dem Sauerstoff eine Schlüsselrolle zu. Er ist an vielen dieser lebensnotwendigen Reaktionen beteiligt (Böhles, 1991). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist, dass Glukose zur Bildung von Radikalen führen kann (Elstner, 1990). Die Hyperlipidämie begünstigt ebenfalls deren Bildung.

Die funktionellen und strukturellen Veränderungen diabetischer Folgeschäden sind denen oxidativer Prozesse ähnlich. Der Mensch hat Systeme entwickelt, die eine Schädigung durch Radikale verhindern sollen. Alle Systeme zusammen bilden die antioxidative Strategie.

Der Begriff „oxidativer Stress“ bezeichnet eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen oxidativen Prozessen und antioxidativen Schutzmechanismen zugunsten der Oxidativen. Ein erhöhter oxidativer Stress gilt als ein kausaler Faktor für viele Krankheiten, u. a. die Katarakt, Herz-Kreislaufkrankungen (KHK) und das Altern. Ebenso wird ein Zusammenhang mit diabetischen Folgeschäden diskutiert (Thomas, 1999).

Ein erhöhter oxidativer Stress bei Diabetikern wird durch die Autoxidation von Glukose, die Bildung von Radikalen durch advanced glycosylated endproducts (AGE-Produkte), die Aktivierung von Monozyten sowie einem verminderten antioxidativen Schutz erklärt.

So scheint die Regeneration der antioxidativen Systeme vermindert zu sein. Als Ursache dafür wird der Mangel an Nikotinamadenindinukleotid (NADH) bzw. Nikotinamadenindi-nukleotidphosphat (NADPH) diskutiert. Beide Substanzen werden für die Regeneration antioxidativer Systeme gebraucht. Da der bei Hyperglykämie vermehrt ablaufende Polyolpathway diese ebenfalls benötigt, kann es zu einem Mangel an NADH bzw. NADPH kommen (Rösen, 1994). Hotta vermutet deshalb einen Einfluss des Polyolpathways auf alle diabetischen Folgeschäden (Hotta, 1997).

Zusätzlich erhöhen reaktive Ketoaldehyde oder Wasserstoffperoxide, die bei der Glukoseautoxidation, der nichtenzymatischen Glykosylierung, und durch glykosylierte Proteine entstehen, den oxidativen Stress (McCarty, 1998). Diese Prozesse können den bei Diabetikern gefundenen erhöhten Malondialdehyd- und Lipidperoxidspiegel als Marker des oxidativen Stresses erklären (Rösen, 1994).

Für die Entwicklung der Makroangiopathie werden folgende Ursachen diskutiert. Eine Aktivierung von Thrombozyten führt zur Freisetzung des platelet derived growth factor, Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und Serotonin. Dadurch kann es zu einer paradoxen Gefäßkonstriktion mit einer Endotheldysfunktion kommen. Aktivierte Monozyten setzen endotheltoxische Monokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor (TNF) frei. Zusätzlich kann das Endothel durch Radikale (Superoxidanionen) oder Radikalprodukte (Lipidperoxide, oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte (oLDL)) angegriffen werden. Dadurch kann eine erhöhte Permeabilität, eine verminderte Antithrombogenität und eine verminderte fibrinolytische Aktivität entstehen (Rösen, 1994).



Für die diabetische Glomerulosklerose und damit Nephropathie wird eine Überproduktion des Tumor growth factor beta (TGF-beta) von Mesangialzellen verantwortlich gemacht (McCarty, 1998).

Zur Prophylaxe bzw. Behandlung der oben genannten Störungen werden vor allem die Blutzuckerkontrolle sowie die Blutdruckkontrolle mit ACE-Hemmern und Kalziumantagonisten empfohlen (Breyer, 1995; Parving, 1998; Mimran et al., 1990; Carella et al., 1994).

Die antioxidativen Vitamine E und C sind in der Lage, Radikale abzufangen. Zusätzlich zeigt vor allem Vitamin E eine positive Wirkung auf die Proteinglykosylierung. Die Proteinfragmentierung konnte durch beide Substanzen verringert werden (Ceriello et al., 1992; Hunt et al., 1991).

**In der vorliegenden Studie soll deshalb die Hypothese einer positiven Beeinflussung von diabetischen Folgeschäden, insbesondere der diabetischen Nephropathie durch die antioxidativen Vitamine E und C überprüft werden.**

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Der Sauerstoff**

Im Grundzustand ist Sauerstoff reaktionsträge, da zwei Elektronen in der 2p-Schale im  $\pi^*$  Niveau vorliegen. Um Sauerstoff zu aktivieren, muss dieser Zustand geändert werden. Diese Änderungen können durch Energie- oder Elektronenzufuhr erfolgen. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (Elstner, 1990).

Nach der ersten Ein-Elektronen-Reduktion entsteht das Superoxidanion. Die zweite Reduktion lässt das Wasserstoffperoxid entstehen, und nach erneuter Reduktion wird das OH-Radikal gebildet (Elstner, 1990).

### 2.1.1. Singulett-Sauerstoff

Der Singulett-Sauerstoff entsteht auf physikalischem Wege durch Energietransfer ohne eine Änderung der Elektronenanzahl. Durch den Transfer wird der Spin der äußeren Elektronen antiparallel, das „Spin-Verbot“ aufgehoben und das Sauerstoffmolekül aktiviert (Elstner, 1990).

### 2.1.2. Superoxidanion

Das Superoxidanion wird physiologisch im Körper gebildet. Es ist reaktionsträge und kann deshalb über weite Strecken diffundieren. Die in Zytoplasma und Mitochondrien vorkommende Superoxiddismutase (SOD) baut das Superoxidanion zum reaktiveren Wasserstoffperoxid um. Die normale Konzentration in der Leber beträgt  $10^{-11}$  Mol pro Liter (mol/l). Bei Anwesenheit von Metallionen kann die Haber-Weiß-Reaktion ablaufen (Thomas, 1999):

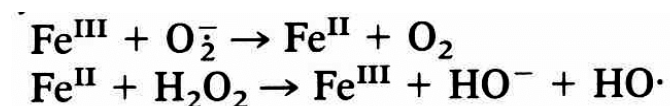


Abb. 1: Die metallkatalysierte Haber-Weiß-Reaktion (Thomas, 1999)

### 2.1.3. Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid entsteht als Abbauprodukt des Superoxidanions, in Peroxisomen und durch zytoplasmatische Enzyme. Es kann relativ weit diffundieren und dabei Membranen durchdringen. Die normale Peroxidkonzentration in der Leber beträgt:  $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  mol/l (Thomas, 1999).

### 2.1.4. Hydroxidradikal

Das Hydroxidradikal entsteht hauptsächlich durch die Haber-Weiß-Reaktion (siehe 2.1.2). Es ist äußerst reaktiv und greift alle umgebenden Strukturen an. Durch die sehr hohe Reaktivität diffundiert es nicht weit (Thomas, 1999).

### 2.1.5. Peroxidradikal

Das Peroxidradikal entsteht bei der Oxidation von Fetten. Diese ist eisenkatalysiert und findet physiologisch bei der Prostaglandinsynthese statt. Peroxidradikale sind reaktionsträge und diffundieren über weite Strecken. Sie können mit Sulfhydrylgruppen reagieren und bilden dabei Thiylradikale (Thomas, 1999).

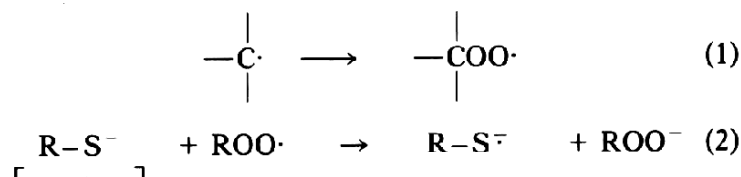


Abb. 2: Reaktionen der Peroxidradikale (Thomas, 1999)

## 2.2. Die Lipidperoxidation als Beispiel für eine radikalische Reaktion

### 2.2.1. Der Mechanismus der Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation stellt eine physiologisch unerwünschte Reaktion dar. Der durch sie verursachte Abbau von Fettsäuren kann zur Destabilisierung von Zellmembranen führen. Sauerstoff spielt in der Reaktionskaskade eine wichtige Rolle. Reagiert ein Radikal mit einer ungesättigten Fettsäure entsteht ein Lipidradikal, welches erneut Fettsäuren angreift. Durch

die Anwesenheit von Sauerstoff wird dieser Prozess unterhalten (Propagation). Ist der Prozess gestartet, kann er nur durch Scavenger (zum Beispiel (z. B.) Vitamin E) oder der Reaktion zwischen zwei Radikalen unterbrochen werden (Jones et al., 1999). Einige Produkte der Reaktionen können als qualitativer und quantitativer Nachweis für die Radikalbelastung dienen. Vor allem Malondialdehyd (MDA) wird als Nachweisprodukt der oxidativen Schädigung benutzt (Thomas, 1999).

### 2.2.2. Physiologische Bedeutung der Radikale am Beispiel des Arachidonsäuremetabolismus

Der zuvor beschriebene Reaktionsmechanismus wird vom menschlichen Organismus auch für die Arachidonsäurekaskade genutzt. Die Endprodukte sind Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene.

Bei aktivierten Leukozyten fördern diese den Entzündungsprozess. Sie wirken auf andere Blutzellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen oder Lymphozyten chemotaktisch. Des Weiteren erhöhen sie den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität. Langfristig kann damit die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose gefördert werden (Jones et al., 1999; Elstner, 1993).

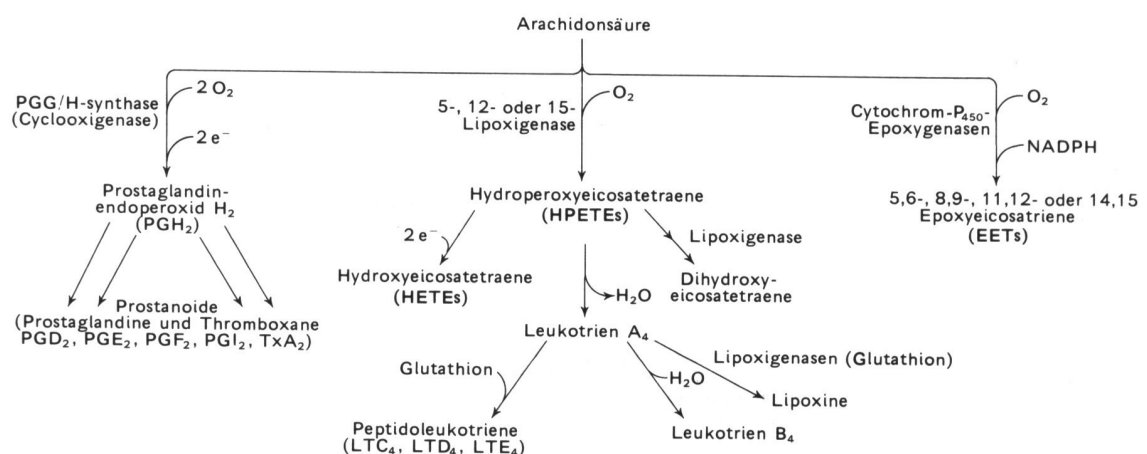


Abb. 3 : Die Arachidonsäurekaskade (Elstner, 1993)

### 2.3. Weitere Radikalquellen (Prooxidantien)

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Vielzahl radikalischer Reaktionen, die teils physiologischer, teils pathologischer Natur sind.

<b>Mögliche Quellen und Produktionsorte aktivierter Sauerstoffspezies</b>	
<b>1. Autoxidationsreaktionen (inkl. „Redox cycling“)</b>	
Chinone	Aromatische Nitroverbindungen, aromatische Hydroxylamine
Redoxfarbstoffe (z.B.: Paraquat)	Melanin
Thiole	Tetrahydropteridine
Flavine (FADH <sub>2</sub> , FMNH <sub>2</sub> )	Eisenkomplexe
<b>2. Enzymatische Reaktionen und Proteine</b>	
Aldehydoxidase	
Cytochrom P-450	Ferredoxin
Hämoglobin	Indolamin-Dioxygenase
NADH-Cytochrom-b5-Reduktase	NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase
NADPH-Oxidase	Peroxidase
Tryptophan-Dioxygenase	Xanthin-Oxidase
<b>3. Zelluläre Quellen</b>	
Mitochondriale Elektronentransportkette (Atmungskette)	Chloroplasten Photosystem I
Mikrosomale Elektronentransportkette (Drogenoxidation)	Bakterielle Elektronen-Transportketten
Leukozyten und Makrophagen	

<b>4. Umweltfaktoren</b>	
	Ultraviolettes Licht
Ultraschall	Röntgenstrahlen
Gammastrahlen	Toxische Chemikalien
Metallionen	

Tab. 1: Quellen aktivierter Sauerstoffspezies (Elstner, 1990)

## 2.4. Antioxidative Mechanismen

Die antioxidativen Mechanismen aerober Zellen sollen entweder die Entstehung gefährlicher Sauerstoffspezies verhindern oder die Reaktion mit zelleigenen Molekülen verhindern.

Die Zelle hat vier Möglichkeiten zur Auswahl:

1. niedermolekulare Substanzen, die Radikale abfangen können (Scavenger bzw. Quencher aktivierter Sauerstoffspezies)
2. Enzyme, die reaktive Sauerstoffspezies in inaktive Moleküle überführen
3. Rekonstitutionssysteme, die „gebrauchte“ niedermolekulare Substanzen via Elektronen-Transportketten regenerieren
4. Reparatursysteme, die geschädigte Moleküle erkennen und ersetzen (Elstner, 1993).

Damit antioxidative Systeme optimal wirken können, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

1. der Wirkort bzw. der Entstehungsort der Radikale muss erreicht werden
2. aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Radikalen muss das System zur richtigen Zeit am Entstehungsort verfügbar sein
3. die antioxidativen Systeme müssen eine günstigere Reaktionskonstante als die umliegenden Strukturen mit den Radikalen aufweisen
4. Die Konzentration der Radikalfänger am Wirkungsort muss ausreichend hoch sein (Elstner, 1993).

## 2.4.1. Niedermolekulare Substanzen

### 2.4.1.1. Die antioxidativen Vitamine

#### 2.4.1.1.1. Ascorbinsäure

##### 2.4.1.1.1.1. Strukturformel

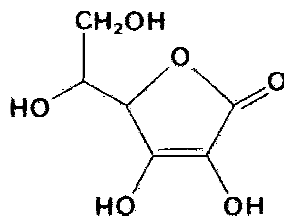


Abb. 4: Die Ascorbinsäure (Elstner, 1990)

##### 2.4.1.1.1.2. Funktion

Vitamin C ist u. a. an der Kollagensynthese, der Karnitinsynthese und der Neurotransmittersynthese beteiligt sowie als Antioxidans wirksam (Bode, 1997). Die klassische Mangelerkrankung ist der Skorbut, der schon den Ärzten in der Antike bekannt war (Friedrich, 1987).

Vitamin C kann wasserlösliche Radikale schnell abfangen und ist dabei im Plasma wirksamer als Bilirubin und Harnsäure (Niki, 1991). Ascorbinsäure fängt Singulett-Sauerstoff, Hydroxyl-, Peroxyl- und Superoxidradikale ab (Elstner, 1990; Jacobs, 1999).

Im Gegensatz zu anderen wasserlöslichen Antioxidantien (z. B. Harnsäure) ist es in der Lage, mit Tokopherolen oder Glutathion zu interagieren (Niki, 1991; Elstner, 1990). Dabei oxidiert Askorbat über Monodehydroaskorbat zu Dehydroaskorbat (DHA). Durch die NADH-

Monodehydroaskorbat- und Glutathion (GSH) – Dehydroaskorbatreduktase können beide Produkte zu Askorbat reduziert werden (Niki, 1991).

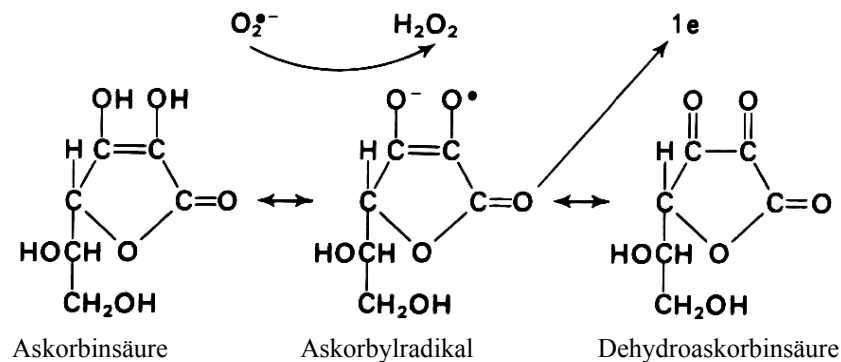


Abb. 5: Die Redoxstufen der Ascorbinsäure (Elstner, 1990)

Formal entspricht Vitamin C in seiner Funktion damit dem NADH bzw. NADPH. Oxidative Schäden auf zellulärer Ebene treten erst auf, wenn der Askorbatpool stark abgebaut ist (Elstner, 1990).

#### 2.4.1.1.1.3. Pharmakologie und Toxikologie

Askorbat wird im Intestinum durch einen aktiven Prozess absorbiert. Dieser ist dosisabhängig sättigbar. Für einen verbesserten Membrandurchtritt wird es in Dehydroaskorbat überführt.

Bei Tieren liegt die halbletale Dosis (LD 50) je nach Spezies und Applikationsart unterschiedlich hoch. Bei oraler Gabe liegt sie zwischen 1 Gramm pro Kilogramm Körpergewicht (g/kg KG) bei der Katze und 8 g/kg KG bei der Maus (Friedrich, 1987). Die in der vorliegenden Studie gewählte Dosierung liegt für einen 75 kg schweren Menschen bei etwa 0,02 g/kg KG (= 1,5g/d) und damit weit unter der bei den Tierspezies festgestellten LD 50.



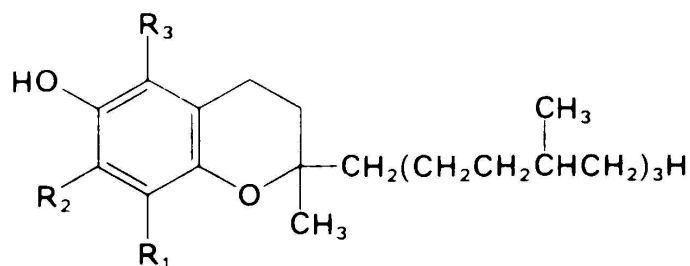
Als Nebenwirkungen wurden gastrointestinale Symptome wie Diarrhoe oder eine leichte Gastroenteritis beschrieben. Die Dosierungen lagen zwischen 3 g und über 30 g pro Tag mit einer Einnahmedauer von bis zu 2,5 Jahren (Friedrich, 1987).

Eine erhöhte Ascorbatzufuhr führt bei gesunden Probanden zu einer vermehrten Oxalatausscheidung. Jedoch wird dadurch der Körperoxalatpool nicht signifikant erhöht, so dass ein erhöhtes Oxalatsteinrisiko nur für bereits an Oxalatsteinen Erkrankten besteht (Jacobs, 1999).

Ob eine sehr hohe Zufuhr an Vitamin C ein prooxidatives Potential besitzt, ist zur Zeit strittig. Vor allem Schwangeren (erhöhtes prooxidatives Potential bei Frühgeborenen mit hohem Ascorbat Spiegel) und Patienten mit zystischer Fibrose wird zu vorsichtiger Dosierung geraten (Jacobs, 1999).

#### 2.4.1.1.2. Die Tokopherole

##### 2.4.1.1.2.1. Strukturformel



$\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -T):  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$   
 $\beta$ -Tocopherol ( $\beta$ -T):  $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$   
 $\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -T):  $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{H}$   
 $\delta$ -Tocopherol ( $\delta$ -T):  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = R_3 = \text{H}$

Abb. 6: Die Molekülgruppe der Tokopherole (Eltner, 1990)

### 2.4.1.1.2.2. Funktion

Vitamin E wirkt als Radikalfänger – vor allem des Singulett-Sauerstoffs - in lipophilen Strukturen wie Zellmembranen. Dort schützt es mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Cholesterin vor der Oxidation durch lipophile Radikale. Es kann in dieser Funktion in Zellmembranen nicht durch andere Radikalfänger ersetzt werden.

Seine Wirksamkeit beruht auf der Möglichkeit in drei verschiedenen Redoxstufen vorzukommen:

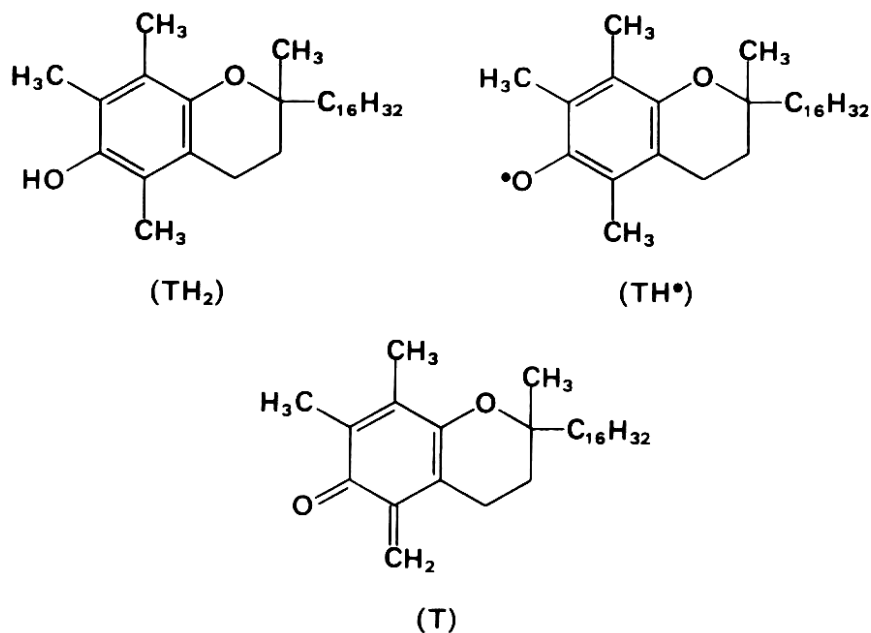


Abb. 7: Die drei Redoxstufen des Tokopherols (Elstner, 1990)

Das oxidierte Tokopherolmolekül kann durch Vitamin C reduziert werden und steht dadurch erneut als Antioxidans zur Verfügung. Ebenso kann Vitamin E Membranproteine vor oxidativen Veränderungen schützen.

Neben seiner antioxidativen Wirkung scheint Vitamin E Enzyme inhibieren zu können. Wird die Lipoxigenase gehemmt, kommt es zu einer Verschiebung im Arachidonsäurestoffwechsel und in der Prostaglandinsynthese. Auch die Proteinkinase-C (PKC) scheint durch Vitamin E beeinflussbar zu sein (Elstner, 1990; Traber, 1999).

#### **2.4.1.1.2.3. Pharmakologie und Toxikologie**

Vitamin E besteht aus einer Vielzahl von Molekülen mit unterschiedlicher biologischer Aktivität. Dieser Unterschied beruht vor allem auf verschiedenen Resorptions- und Retentionsmodi. Daher werden die Vitamin-E-Aktivitäten in Internationale Einheiten (IE) angegeben und damit vergleichbar gemacht (Friedrich, 1987).

Im Plasma überwiegt die Alphaform des Tokopherols. Vitamin E wird mit der Nahrung aufgenommen und gelangt in den Chylomikronen über die Lymphe ins Blut. Dort wird Vitamin E auf die anderen Lipoproteine verteilt.

Die Chylomikronenremnants transportieren Vitamin E in die Leber, welche es in Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) einbaut und an das Blut abgibt. Aus den VLDL gelangt das Vitamin E durch deren Abbau in die LDL. Zwischen LDL und Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) findet ein nichtenzymatischer Konzentrationsausgleich statt. Über die LDL gelangt Vitamin E in die Zellen (Traber, 1999).

Vitamin E ist akut auch in hohen Dosen untoxisch und bei chronischer Einnahme nur gering toxisch. Vitamin E besitzt keine mutagenen, teratogenen und kanzerogenen Eigenschaften.

Als Nebenwirkungen bei oraler Zufuhr sind Müdigkeit, Schwäche, Darmkrämpfe, Brustschmerzen, Thrombophlebitis und Akne beschrieben. Zusätzlich sind verzögerte Wundheilung, gestörte Fibrinolyse, Amenorrhöe sowie Sehstörungen beschrieben. In den meisten Fällen handelt es sich um Einzelfälle oder Daten aus nicht kontrollierten Studien. (Friedrich, 1987; Kasper, 2000).

In einer Dosierung von 100 – 3.000 IE pro Tag und bis zu 24 Wochen gegeben, berichtet Friedrich nur von vereinzelt, jedoch nicht toxischen Nebenwirkungen (Friedrich, 1987). Kasper hingegen beschreibt eine Studie mit gesunden Probanden, die bei einer Dosierung von 800 Milligramm (mg) nach dem Auftreten von Nebenwirkungen wie Anämie und Schwäche abgebrochen wurde (Kasper, 2000).

Eine Kontraindikation stellt eine Antikoagulationstherapie dar. Jedoch kann die antikoagulative Aktivität hoher Vitamin-E-Dosen (1.200 IE/d) auch therapeutisch genutzt werden (Friedrich, 1987).

Bisher gibt es nur in-vitro-Daten über ein prooxidatives Potential von Vitamin E. In vivo sind diese nicht verifiziert worden (Traber, 1999).

#### **2.4.1.2. Sonstige niedermolekulare Antioxidantien**

Neben den beschriebenen Vitaminen gibt es noch eine Vielzahl anderer niedermolekularer Substanzen, die antioxidatives Potential besitzen. Von diesen soll die Harnsäure näher beschrieben werden.

##### **2.4.1.2.1. Funktion der Harnsäure**

Es existiert eine Theorie über die Beziehung zwischen der Möglichkeit des Harnsäureabbaus und der Vitamin-C-Synthese bei Säugetieren. Nur wenige Spezies besitzen nicht mehr die Fähigkeit der Ascorbatsynthese und des Harnsäureabbaus. Nach dieser Hypothese verlor der Mensch in seiner Entwicklungsgeschichte in etwa gleichzeitig beide Fähigkeiten. Da beide Moleküle antioxidativ wirksam sind, konnte die Harnsäure die Funktion des Vitamin C übernehmen. Der Harnsäure wird sogar eine höhere antioxidative Potenz zugesprochen, so dass es dadurch zu einer gesteigerten Lebenserwartung gekommen sein soll.

Ascorbat und Harnsäure besitzen in vitro gleich gute antioxidative Fähigkeiten, um Strangbrüche in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu verhindern. Jedoch kann Harnsäure nicht mit Glutathion oder Vitamin E interagieren, so dass es nicht die volle Funktionsvielfalt des Vitamin C besitzt (Elstner, 1990).

## 2.4.2. Die enzymatischen Systeme

Neben den antioxidativ wirksamen Molekülen besitzt der Mensch Enzymsysteme, die die Radikale abbauen. Die wichtigsten antioxidativen Enzymsysteme sind die Katalase, die SOD, die Glutathionperoxidase und die Glutathion-S-Transferase (Elstner, 1990).

### 2.4.2.1. Die Katalase

Die Katalase ist ein Hämprotein, welches die folgende Reaktion katalysiert.

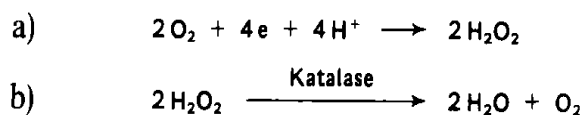


Abb. 8: Reaktionsgleichungen der Katalase (Elstner, 1990)

Die höchste Katalasekonzentration befindet sich in Peroxisomen. Bei Zellen, die keine Peroxisomen besitzen (z. B. Erythrozyten), befindet sich das Enzym im Zytoplasma (Thomas, 1999).

### 2.4.2.2. Die Superoxiddismutase

Die SOD ist eine der wichtigsten antioxidativen Enzyme. Sie kommt im Zellzytoplasma und in den Mitochondrien vor. Ein Fehlen dieses Enzyms ist tödlich, jedoch bringt ein Überschuss aufgrund des entstehenden Wasserstoffperoxids keine Vorteile.

Die Superoxiddismutase beschleunigt die Dismutation von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  10000fach

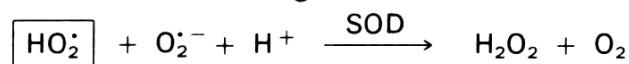


Abb. 9: Die Superoxiddismutase (Elstner, 1993)

### 2.4.2.3. Die Glutathionperoxidase und Glutathion-S-Transferase

#### 2.4.2.3.1. Die Strukturformel

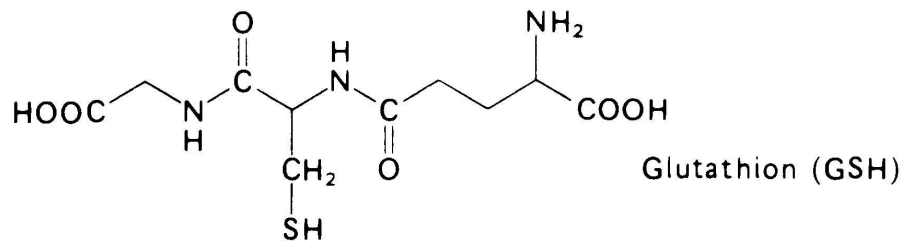


Abb. 10: Das Glutathion (Elstner, 1993)

#### 2.4.2.3.2. Funktion

Die Glutathionperoxidase und -S-Transferase entsorgen über das Glutathion organische Peroxide und Hydroperoxide. In Kompartimenten mit einem geringen Wasserstoffperoxidaufkommen kommt der Glutathionperoxidase ein größerer Stellenwert zu als der Katalase. Die Glutathionperoxidase kann mit Radikalen reagieren und dadurch zum Kettenabbruch von radikalischen Reaktionen führen (z. B. bei der Lipidperoxidation).

Glutathion ist in der Lage, Metalle komplex zu binden, wodurch diese keine radikalischen Reaktionen triggern können. Zur Regeneration des Glutathion wird NADH bzw. NADPH benötigt.

Es existieren zwei Formen der Glutathionperoxidase, von denen eine selenabhängig ist (Elstner, 1990).

### 2.4.3. Reparatursysteme

Nicht alle Radikale können rechtzeitig abgefangen werden. Es kommt zu oxidativen Veränderungen an Membranen und Proteinen. Damit nicht immer der Zelltod eintritt, existieren Mechanismen, um diese Schäden zu beheben. Proteasen können oxidativ geschädigte Proteine autohydrolytisch abbauen.

Eine oxidierte Fettsäure in einer Membran wird durch folgende Mechanismen ersetzt. Ein Fettsäureperoxid wird durch eine Phospholipase herausgetrennt. Das Peroxid wird durch die Glutathionperoxidase entsorgt und anschließend eine nicht oxidierte Fettsäure in die Membran eingebaut. Dadurch kann eine geschädigte Membran wiederhergestellt werden. Ein ähnliches System sorgt für die Regeneration der DNS.

Die Abbildung 11 zeigt die Komplexität und Vielfalt der antioxidativen Schutzmechanismen.

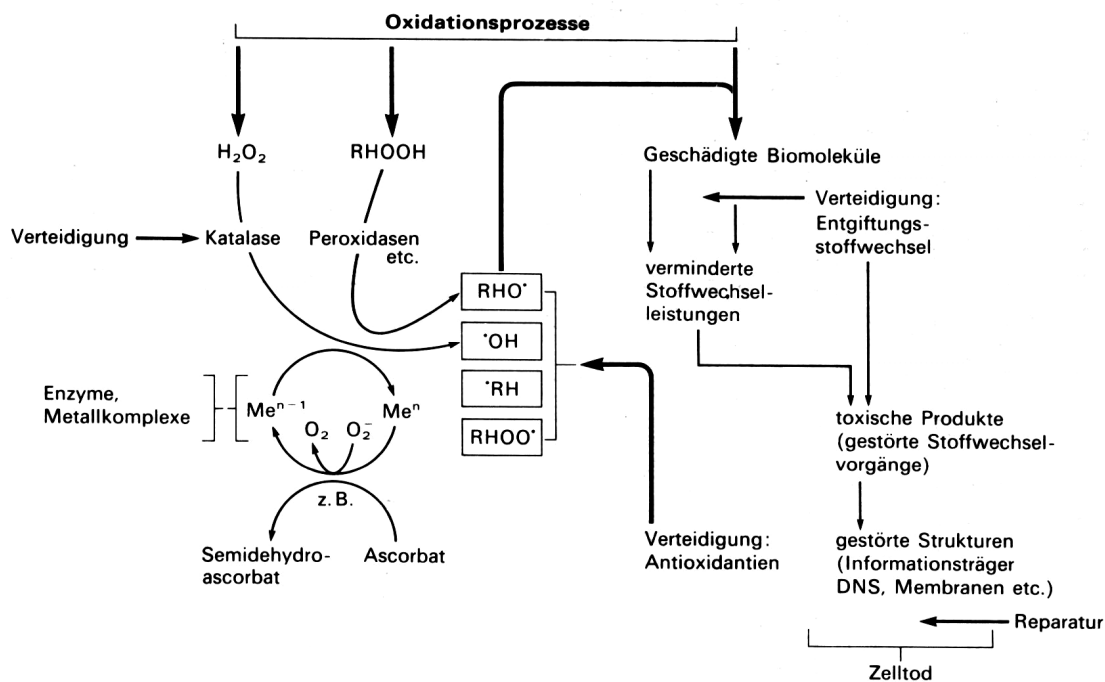


Abb. 11: Antioxidative Schutzsysteme (Eltner, 1990)

#### 2.4.4. Synergismus antioxidativer Systeme (Rekonstitutionssysteme)

Um den antioxidativen Schutz zu verstärken, können hydrophile Antioxidantien mit hydrophoben interagieren und diese regenerieren. Die Vitamine C und E sind ein Beispiel für diesen Synergismus.

Wird in eine Liposomenmembran ein lipophiles Radikal eingebracht, so kommt es zu einer sehr schnellen Oxidation des in der Membran befindlichen Phosphatidylcholins, wenn keine Antioxidantien vorhanden sind. Wird dem System Vitamin C zugegeben, verändert sich die Oxidationsgeschwindigkeit des Phosphatidylcholins nicht. Wird statt Vitamin C Vitamin E zugesetzt, verlangsamt sich die Geschwindigkeit. Bei Zugabe von Vitamin E und C tritt eine starke Verlangsamung der Oxidationsgeschwindigkeit ein. Diese Geschwindigkeitsreduktion hält an, solange Vitamin C vorhanden ist. Ist es aufgebraucht, entspricht die Geschwindigkeit wieder der nach alleiniger Zugabe von Vitamin E.

Dieser Synergismus kann sowohl in homogenen wie auch heterogenen Systemen beobachtet werden. Er tritt jedoch nur bei lipophilen Radikalenreaktionen auf, da Vitamin C das Vitamin E regenerieren kann, jedoch keine umgekehrte Regeneration möglich ist. Diese Aufgabe kann jedoch von der  $\alpha$ -Liponsäure übernommen werden (Niki, 1991; Packer, 1992).

Für diese Reaktionen wird das im Intermediärstoffwechsel gebildete NADH bzw. NADPH benötigt. Als wichtigste Reaktion zur Bereitstellung gilt die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasereaktion. Daneben können die Glyzerinaldehyddehydrogenase oder die Laktatdehydrogenase dieselbe Funktion übernehmen (Elstner, 1990).

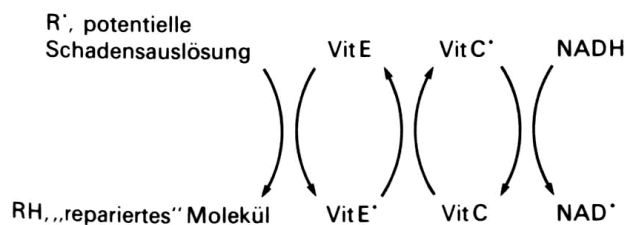


Abb. 12: Regeneration von Vitamin E und C (Elstner, 1990)



## **2.5. Krankheitsbilder mit Radikalbeteiligung**

Bei vielen Krankheiten wird eine Beteiligung unterschiedlicher Radikale und Radikalbildnern postuliert.

### **I Hyperbarer Sauerstoff und Hyperoxie**

- A) Retrolentale Fibroplasie
- B) Pulmonale Respirationsprobleme
- C) Ischämie-Reperfusionsschäden

### **II Hypo-Oxygenierung**

- A) Systemische Hypoxie
- B) Schocksyndrome

### **III Gifte, Chemikalien**

- A) Paraquat u.a. Redoxzyklisierer
- B) Tertrachlorkohlenstoff u.a. Lösungsmittel (-artige)
- C) Chemotherapie (Adriamycin usw.)
- D) Nitroverbindungen (Nitrofurantoin, Nitrophenole)
- E) Karzinogene, Xenobiotika (Benzpyren, PCB's)

### **IV Drogeninduzierte hämolytische Anämie**

(Phenylhydrazin)

### **V Vitamindefizite**

- A) Vitamin A
- B) Vitamin C
- C) Vitamin E

**VI Alterungsprozesse**

- A) Katarakt
- B) Lipofusine

**VII Akute Entzündungszustände**

- A) Verbrennungen
- B) Infektionen
- C) Pulmonale Ödeme
- D) Zerebrale Ödeme

**VIII Chronische Entzündungszustände**

- A) Rheumatoide Arthritis
- B) Emphysem (Inaktivierung der  $\alpha$ -1-Antiproteinase)
- C) Behcets Disease
- D) Krebs
- E) Diabetes
- F) Katarakte

**IX Strahlenschäden**

- A) Sonnenbrand
- B) Strahlentherapie
- C) „Strahlenkrankheit“ (radioaktive Unfälle)

**X Luftverschmutzung**

- A) Fotooxidantien ( $\text{NO}_x$ ,  $\text{O}_3$ , PAN)
- B)  $\text{SO}_2$ ,  $\text{HSO}_3^-$
- C) Dieselrußpartikel, Asbestfasern
- D) Zigarettenrauch

(Elstner, 1993)

## **2.6. Oxidativer Stress bei Diabetes mellitus und sein Einfluss auf die diabetischen Folgeschäden**

### **2.6.1. Erhöhter oxidativer Stress bei Diabetikern**

Es wurde lange diskutiert, ob bei Diabetikern ein erhöhter oxidativer Stress besteht. Das lag vor allem daran, dass es keine guten Parameter zu dessen Messung gab (Ceriello et al., 1997). Eine erhöhte Radikalbildung kann entweder direkt als Chemilumineszenz oder indirekt über MDA oder konjugierte Diene bestimmt werden (Rösen et al., 1991; Kaji et al., 1985). Besonders geeignet scheinen Marker der Lipidperoxidation zur Messung der Radikalenbelastung zu sein. Sie werden von vielen Autoren zur Einschätzung benutzt (Rösen, 1994).

Als weitere indirekte Methode benutzte Ceriello den total-trapping-antioxidant-Parameter (TRAP). Dieser Wert kann fluorimetrisch gemessen oder mathematisch über die Serumkonzentration mehrerer Antioxidantien ermittelt werden. Unterschiede zwischen dem gemessenen TRAP und berechneten TRAP ergeben sich aus der Nichterfassung aller Antioxidantien im Plasma sowie möglicher Synergismen zwischen den Antioxidantien. Es zeigte sich, dass beide Werte trotzdem statistisch signifikant miteinander korrelieren. Die Höhe beider Messgrößen war bei Diabetikern gegenüber Nichtdiabetikern signifikant erniedrigt, was entweder auf eine höhere Radikalbildung oder eine verminderte antioxidative Kapazität bei Diabetikern schließen lässt (Ceriello et al., 1997).

Bei diabetischen Ratten wurde gezeigt, dass die Gewebekonzentration an Lipidperoxiden höher liegt als bei gesunden Ratten. Gleichzeitig wurden signifikant niedrigere Vitamin-C-Spiegel in Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Niere und Plasma gemessen. Demgegenüber steigt die Konzentration an Vitamin E in Herz, Leber, Muskel und Plasma an (Sun et al., 1999).

Nicht alle Parameter zur Bestimmung der Radikalenbelastung zeigen ein einheitliches Bild, wie die Messwerte (Nichtdiabetiker/Diabetiker) der Arbeitsgruppe um Kaji zeigen:

1. Plasmalipidperoxide: 1,71 Mikromol pro Liter ( $\mu\text{mol/l}$ ) gegenüber 2,32  $\mu\text{mol/l}$ ; Signifikanzniveau kleiner 0,001 ( $p < 0,001$ )
2. Plasmaglutathionperoxidase: 5,9  $\mu\text{mol/l}$  gegenüber 6,9  $\mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0,01$

3. Erythrozyten Glutathionperoxidase, Katalase und SOD unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kaji et al., 1985).

Wird diabetischen Ratten Vitamin E und C sowie  $\beta$ -Karotin gegeben, so verändern sich einige antioxidative Parameter in der Niere, die als Maßstab für oxidativen Stress angesehen werden:

1. die MDA-Konzentration wird reduziert
2. die Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidase und Glutathion-S-Transferase wird reduziert.

Demgegenüber verändert sich die Katalaseaktivität nicht (Mekinova et al., 1995).

Nourooz-Zadeh findet bei 22 Typ-2-Diabetikern einen mit  $9,0 \mu\text{mol/l}$  gegenüber  $3,8 \mu\text{mol/l}$  bei Nichtdiabetikern signifikant erhöhten Lipidhydroperoxidspiegel ( $p < 0,001$ ). Bei der Plasma- MDA-Konzentration konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Typ-2-Diabetikern und der nichtdiabetischen Kontrolle nachgewiesen werden (Nourooz-Zadeh et al., 1995).

Eine Studie von Tada und Mitarbeitern zeigt, dass ein erhöhter Glukosespiegel einen Einfluss auf den Peroxidspiegel haben könnte. Sie stellten bei der Inkubation von Mesangialzellen in ein Medium mit einer Glukosekonzentration von 33 Millimol pro Liter ( $\text{mmol/l}$ ) einen Anstieg von Lipidperoxiden fest (Tada et al., 1997).

Bei den folgenden Reaktionen scheint es bei einer Hyperglykämie zu einer vermehrten Radikalbildung zu kommen: der Glykosylierung, der Autoxidation von Glukose und durch die intrazelluläre Aktivierung des Polyolpathway. Dieser führt zu einer Verarmung von NADH. NADH wird zur Regeneration von Antioxidantien benötigt. Durch diesen Mangel kann es zu einer Konzentrationsabnahme an Antioxidantien, mit daraus folgender Erhöhung der Radikalschädigungen, kommen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Wirkung von Antioxidantien auf glukoseinduzierte Veränderungen. Bekannt sind z. B. Einflüsse auf die Vasokonstriktion, die Koagulationsaktivierung und Änderungen der intrazellulären Adhäsionsmolekül-1-Konzentration (Ceriello, 1997).

Kedziora-Kornatowska untersuchte bei nichtdiabetischen Probanden, bei Typ-2-Diabetikern mit gesicherter Nephropathie und bei langjährigen Typ-2-Diabetikern ohne Nephropathie und ohne Bluthochdruck die MDA-Konzentration in Erythrozyten sowie die Aktivitäten der SOD und Katalase.

Der MDA-Gehalt war bei den Typ-2-Diabetikern mit Nephropathie und den Diabetikern ohne Nephropathie signifikant höher als bei der nichtdiabetischen Kontrollgruppe. Die höchsten MDA-Werte lagen bei den Probanden mit Nephropathie vor. Die Enzymaktivitäten wiesen einen inversen Zusammenhang auf. Die Aktivitäten sanken in der Reihenfolge Nichtdiabetiker, Diabetiker ohne Nephropathie und Diabetiker mit Nephropathie (Kedziora-Kornatowska et al., 1998).

Zur Verminderung von radikalischen Schäden stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

1. die Radikalbildung wird vermindert
2. die antioxidative Kapazität wird erhöht.

Wenn die Hyperglykämie in einem kausalen Zusammenhang mit einer vermehrten Radikalbildung steht, führt eine gute Stoffwechseleinstellung zu einer geringeren Radikalbelastung.

Douillet und Mitarbeiter können durch die Supplementierung mit Selen und oder Vitamin E bei diabetischen Ratten den Spiegel an Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBARS) und konjugierten Diene gegenüber normal gefütterten Ratten signifikant senken (Douillet et al., 1996).

## **2.6.2. Erhöhte Prooxidantien**

### **2.6.2.1. Glukose als Radikalbildner**

Ende der 70er-Jahre schrieb Sato über Glukose als Radikalbildner. Beim Vergleich von 331 Nichtdiabetikern und 110 Diabetikern findet er bei den Diabetikern eine erhöhte MDA-Konzentration [5,3 Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) MDA gegenüber 3,7 nmol MDA/ml bei den Nichtdiabetikern].

Zusätzlich werden die Diabetiker in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Blutzuckerhöhe aufgeteilt. Gruppe 1 bilden die Diabetiker mit einem Blutzucker (Bz) unter 140 Milligramm pro Deziliter (mg/dl), und in Gruppe 2 kommen Probanden mit einem Blutzucker über 140 mg/dl. Die MDA-Konzentration ist bei Gruppe 1 mit 4,0 nmol MDA/ml kleiner als bei Gruppe 2 mit 6,0 nmol MDA/ml.

Keinen Zusammenhang findet Sato zwischen der MDA-Konzentration und den Konzentrationen an Triglyzeriden (TG) und Cholesterin sowie dem Ergebnis eines Glukosetoleranztests. Jedoch haben Diabetiker mit Angiopathie im Vergleich zu Diabetikern ohne Angiopathie ebenfalls erhöhte MDA-Spiegel (Sato et al., 1979).

Jain und Mitarbeiter untersuchen in einer Studie den Einfluss der Hyperglykämie auf die Vitamin E- und Lipofuszingkonzentration als Marker des oxidativen Stresses. Die Ratten werden in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe erhält Insulin, die zweite bleibt unbehandelt und eine dritte Gruppe aus nichtdiabetischen Ratten dient zur Kontrolle. Nach 2 Monaten werden die niedrigsten Vitamin E - und die höchsten Lipofuszingkonzentrationen bei den unbehandelten Ratten gemessen. Bei den mit Insulin behandelten Ratten können nur geringe Unterschiede zu den nichtdiabetischen gemessen werden (Jain et al., 1991).

Elstner beschreibt Experimente zu den Reaktionsmechanismen mit Dihydroxyfumarsäure (DHF), welche aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den Zuckern als Modellschubstanz für die Zuckerautoxidation gelten kann.

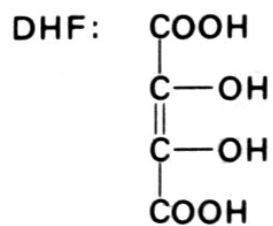
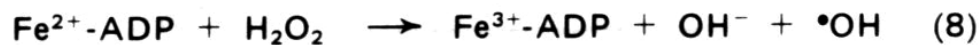
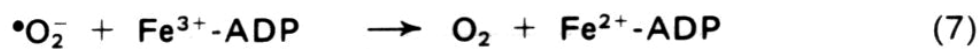
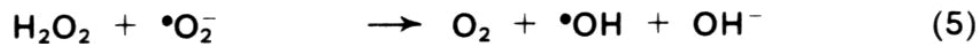
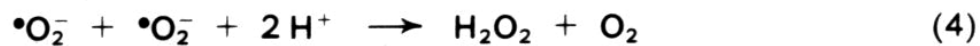


Abb. 13: Die radikalische Reaktionskaskade von DHF (Elstner, 1993)

Die Abbildung 13 zeigt, dass während der Autoxidation von DHF alle bekannten aktivierten Sauerstoffmoleküle entstehen können. DHF wird dabei zu Diketosuccinat oxidiert – Reaktionen 1 - 3. Die verschiedenen Sauerstoffradikale können ebenfalls miteinander reagieren und dabei weitere Radikale produzieren – Reaktionen 4 - 6. Es zeigt sich, dass in dieser Reaktionskette vor allem Superoxidradikale auftreten (Elstner, 1993).





### **2.6.2.2. Die nichtenzymatische Glykosylierung als Radikalbildner**

Bei der nichtenzymatischen Glykosylierung können reduzierende Zucker (z. B. Blutglukose) als Katalysatoren oxidativer Modifikationen und der Bildung von cross-links dienen. (Baynes, 1991; Wolff et al., 1987). Die Zucker zeigen eine unterschiedliche Reaktivität, welche in der Reihenfolge Glyzerinaldehyd, Fruktose und Glukose abnimmt (Hunt et al., 1988).

Durch weitere Umlagerungen entstehen Amadori-Produkte. Bis zu den Amadori-Produkten sind die Reaktionen sowohl konzentrationsabhängig als auch umkehrbar. Es kommt nicht zu einer Akkumulation. Aus den Amadori-Produkten können durch Umlagerungsreaktionen (Maillardumlagerungen) die AGE-Produkte entstehen, wenn die Proteine eine ausreichend lange Halbwertszeit besitzen (Brownlee et al., 1988). Dabei können Superoxidanionen und Wasserstoffperoxide entstehen, welche in Anwesenheit von Metallionen über radikalische Reaktionen zu Schäden an umliegenden Molekülen führen können (Baynes, 1991; Rösen et al., 1991; Packer, 1993). Die Produkte akkumulieren auf den Proteinen, da diese Reaktionen nicht umkehrbar sind (Brownlee et al., 1988). Ihr Anteil ist jedoch quantitativ gering. (Makita et al., 1992).

An den radikalischen Reaktionen sind Metallionen und Wasserstoffperoxide beteiligt. Dieses stammt nicht von einer erhöhten Glukoseautoxidation, da die Konzentration an oxidierbarem Ketoaldehyd sehr gering ist. Für die Fragmentierung von Proteinen werden Wasserstoffperoxide verantwortlich gemacht, da Scavenger bzw. Katalase zwar die Fragmentierung, aber nicht die Glykosylierung verhindern können und das Superoxidanion kaum mit Proteinen reagiert (Hunt et al., 1988; Packer, 1993).

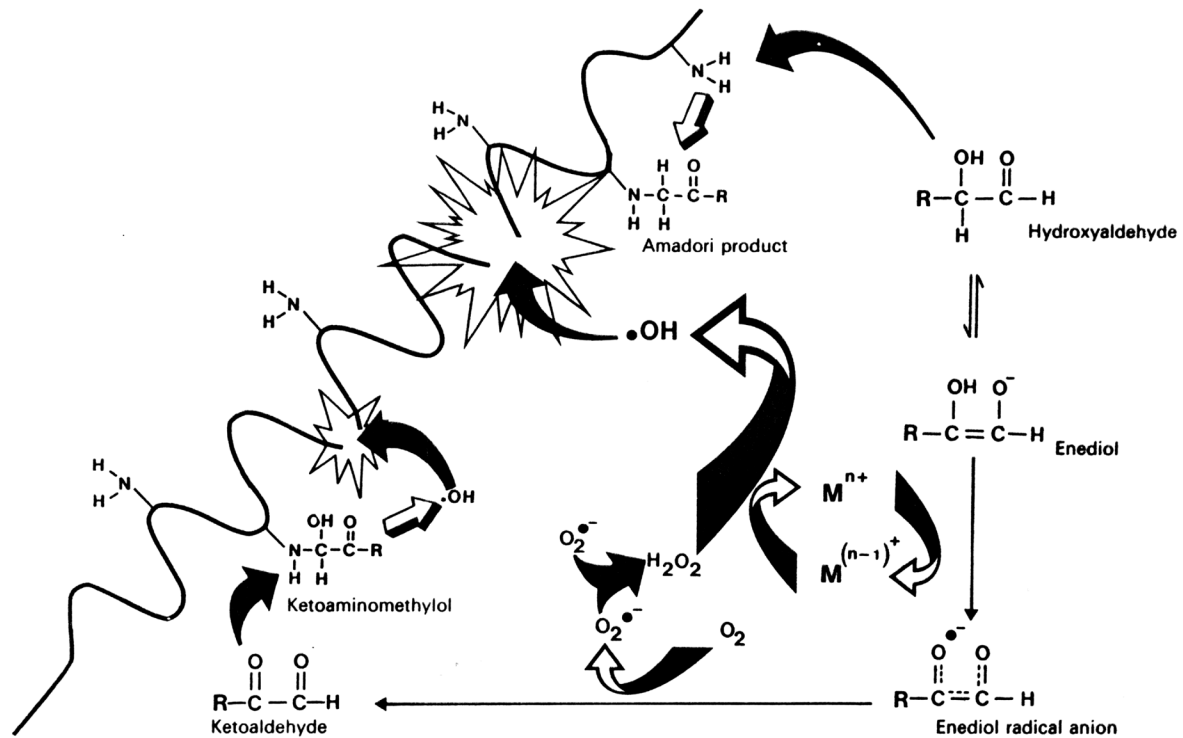


Abb. 15: Die glukoseinduzierte Proteinfragmentierung (Hunt et al., 1988)

Diese Theorie wird durch Untersuchungen über die Auswirkungen erhöhter Glukosekonzentrationen auf die Erythrozytenmembran erhärtet. So wird bei steigender Glukosekonzentration eine ebenfalls steigende MDA-Konzentration in den Membranen gefunden. Die Ursache liegt in einer gesteigerten Lipidperoxidation, da Phospholipid-MDA-Addukte nachweisbar sind. Ebenso steigt mit zunehmender TBA-Reaktivität der Anteil an glykiertem Hämoglobin (Jain, 1989; Jain et al., 1989; Rösen et al., 1991).

### 2.6.3. Erniedrigte Antioxidantien

Yue et al. berichten über einen erniedrigten Plasmaspiegel an Ascorbinsäure bei Diabetikern (Yue et al., 1990). Auch bei diabetischen Ratten wird ein bis zu 50% verringerter Ascorbatspiegel in Leber und Niere gemessen (Bode, 1997).

Die Arbeitsgruppe Armstrong untersucht die Plasmaspiegel an Vitamine C, E sowie  $\beta$ -Karotin bei Typ-2-Diabetikern vor und nach einer Ernährungsberatung. Ziel der Beratung ist eine Verbesserung der Nährstoffzufuhr. Der durchschnittliche Blutzuckerspiegel und die Höhe des HbA<sub>1c</sub> sinken. Die Vitaminspiegel der 20 Typ-2-Diabetiker steigen nach der Beratung an:

1. Vitamin C: von 12,7  $\mu\text{mol/l}$  auf 27,8  $\mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0,01$
2. Lipidkorrigiertes  $\alpha$ -Tokopherol: von 4,4  $\mu\text{mol/mmol Chol}$  auf 5,2;  $p < 0,05$
3.  $\beta$ -Karotin: von 0,13  $\mu\text{mol/l}$  auf 0,17  $\mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0,05$ .

Nur die Nahrungszufuhr an Vitamin C ist nach der Beratung gestiegen. Zusätzlich sinkt der MDA-Spiegel von 2,4  $\mu\text{mol/l}$  auf 1,4 ( $p < 0,01$ ). Der Anstieg an Vitamin E und  $\beta$ -Karotin wird mit einer niedrigeren oxidativen Belastung durch eine bessere Stoffwechsellaage erklärt (Armstrong et al., 1996).

Antioxidantien werden über verschiedene Mechanismen regeneriert. Beim Diabetiker ist die Regeneration von Vitamin E + C sowie Glutathion gestört, da hierzu NADPH benötigt wird. Dieses wird bei Hyperglykämie im verstärkt ablaufenden Polyolpathway bei der Reduktion von Glukose zu Sorbitol verbraucht. (Rösen et al., 1991; Packer, 1993).

Auch Bode findet bei Diabetikern einen erniedrigten Ascorbatspiegel. Zusätzlich stellt er einen erhöhten Dehydroascorbatspiegel im Plasma und in den Leukozyten fest. Dies erklärt er damit, dass Ascorbat durch Radikale zu Dehydroascorbat oxidiert wird. Ein erhöhter Dehydroascorbatspiegel soll neuro- und inselzelltoxisch sein und bei Injektion diabetogen wirken. Deshalb könnte es für die Zelle wichtig sein, ein hohes Ascorbat zu Dehydroascorbatverhältnis aufrecht zu erhalten. Störungen im Ascorbatstoffwechsel werden daher von Bode für das Auftreten weiterer Krankheiten (Leukämie, chronische Entzündungen) mitverantwortlich gemacht (Bode, 1997).

Die Arbeitsgruppe um Ng hat an Lymphoblasten untersucht, ob Störungen in der Versorgung von Zellen mit Ascorbin- bzw. Dehydroaskorbinsäure bestehen. Die Probanden wurden in 4 Gruppen unterteilt:

1. nichtdiabetische Kontrolle,
2. Typ-1-Diabetiker mit Normoalbuminurie,
3. Typ-1-Diabetiker mit Nephropathie und
4. Hypertoniker.

Es zeigt sich eine veränderte DHA-Aufnahme sowohl bei Bluthochdruck als auch bei Vorliegen einer Nephropathie. Die passive Aufnahmerate blieb ohne Unterschiede zwischen den Probandengruppen.

Es kommt durch die erniedrigte Aufnahme an DHA zu einer Verringerung des Vitamin-C-Spiegels in den Lymphoblasten und dadurch zu einem erniedrigten antioxidativen Potential, da Vitamin C in Form des DHA durch Membranen transportiert wird (Ng et al., 1998).

Cunningham und Mitarbeiter stellen zwei Hypothesen zum verminderten Vitamin-C-Gehalt in mononuklearen Zellen bei Diabetikern auf. Diese haben trotz einer hohen oralen Vitamin-C-Zufuhr von 200 mg/d (Nichtdiabetiker: 160 mg/d) und gleich hohem Plasmaspiegel von 85  $\mu\text{mol/l}$  (Nichtdiabetiker: 89  $\mu\text{mol/l}$ ) eine geringere Konzentration an Vitamin C in den Zellen (Nichtdiabetiker: 2,6 mg/g Gesamtprotein; Typ-1-Diabetiker: 1,75) aufweisen. Selbst eine erhöhte Zufuhr an Vitamin C von 600 mg/d kann diesen Unterschied nicht ausgleichen.

Glukose inhibiert die Aufnahme von Dehydroaskorbat passiv und Askorbat aktiv. Deshalb kann erstens ein relativer Insulinmangel und zweitens die Hyperglykämie als Ursache für den veränderten Zellspiegel in Frage kommen (Cunningham et al., 1991).

Bigley und Mitarbeiter finden eine kompetitive Hemmung zwischen Glukose und Dehydroaskorbataufnahme in Neutrophilen und Fibroblasten, so dass beide den gleichen Transporter benutzen müssen. Dieser Transport ist durch Insulingabe zu erhöhen. Bei der Hyperglykämie kommt es zu einem erhöhten Plasma-DHA-Spiegel. Im Gegensatz dazu wird die Glukoseaufnahme in die Zellen jedoch durch die erhöhten DHA-Spiegel effektiv nicht gehemmt, da die Glukosekonzentration wesentlich größer als die DHA-Konzentration ist (Bigley et al., 1983).

Dieser Zusammenhang gilt ebenso für Leukozyten. Zusätzlich ist die Auffüllung des Vitamin-C-Pools bei Diabetikern gehemmt (Chen et al., 1983).

Eine Behebung des Insulinmangels kann die Störungen des Ascorbatmetabolismus nicht beseitigen, da es dadurch zwar zu einem Anstieg des Ascorbatspiegels aber nicht des DHA-Spiegels kommt (Young et al., 1992).

Die Höhe der Plasmakonzentration an Ascorbinsäure korreliert nicht mit der Höhe des Bz-Spiegels. Es zeigt sich aber eine inverse Korrelation zum Anteil des glykosylierten Hämoglobin (GHb) und HbA<sub>1c</sub> (Yue et al., 1990; Bode, 1997).

## **2.7. Die diabetischen Folgeschäden**

Die diabetischen Folgeschäden lassen sich in zwei Kategorien gliedern. Erstens die diabetische Makroangiopathie, deren Pathogenese der Atherosklerose entspricht und damit Diabetes unspezifisch ist. Die zweite Kategorie besteht aus Diabetes spezifischen Erkrankungen. Dazu zählen die diabetische Mikroangiopathie, deren Ursache u. a. die glykosylierten Proteine, die Katarakt sowie die Neuropathie sind. Diesen Erkrankungen liegt als Schädigungsmechanismus vor allem eine Sorbitakkumulation zugrunde.

### **2.7.1. Die diabetische Makroangiopathie**

Für die Entstehung der diabetischen Makroangiopathie werden genetische Faktoren, Übergewicht, Hyperlipoproteinämie, Hyperglykämie, erhöhte Blutviskosität, erhöhte Thrombozytenaggregationsneigung und die arterielle Hypertonie verantwortlich gemacht. Zusätzlich spielt die Insulinresistenz mit daraus folgender Hyperinsulinämie eine Rolle. Als weiterer Risikofaktor für eine koronare Herzerkrankung (KHK) wird die Höhe des Antioxidantienspiegels diskutiert. Dieser ist bei Diabetikern erniedrigt.

Auch Radikale werden als Einflussfaktor auf die Atherogenese diskutiert. Ceriello und Mitarbeiter zeigen diesen Einfluss am Beispiel des Stickoxids (NO). Wenn die Endothelzellen

NO freisetzen, nimmt die Spannung der Gefäßwände ab. Dadurch sinkt der Blutdruck. Die Halbwertszeit von NO beträgt nur wenige Sekunden, da es schnell durch Superoxidanionen abgebaut wird. Bei Diabetikern werden erhöhte Radikalenspiegel u. a. an Superoxidanionen gemessen, siehe oben (s. o.). Dadurch könnte der Abbau der NO-Moleküle beschleunigt werden und diese Imbalance im NO-Stoffwechsel könnte zum Bluthochdruck bei Diabetikern beitragen (Ceriello et al., 1993).

Bei der Entstehung der Atherosklerose wird der extrazellulären LDL-Akkumulation eine Bedeutung beigemessen. Dabei könnte die bei Diabetikern erhöhte cross-links-Bindung von LDL an in Arterienkollagen gebundenen AGE-Produkten ursächlich beteiligt sein. In vitro steigt der Anteil an gebundenem LDL, wenn entweder der AGE-Produktanteil bei konstantem LDL-Spiegel oder der LDL-Spiegel bei konstantem AGE-Produktanteil steigt. Arterienkollagen mit AGE-Produkten bindet LDL dabei etwa 3-mal so stark wie Kollagen ohne AGE-Produkte (Brownlee et al., 1988).

Den Einfluss der Hyperglykämie auf systemische hämodynamische Parameter untersuchen Marfella und Mitarbeiter bei nichtdiabetischen Probanden. Sie stellen einen statistisch signifikanten Anstieg des systolischen bzw. diastolischen Blutdruckes von euglykämischen  $118 \pm 9$  bzw.  $71 \pm 5$  mmHg auf  $138 \pm 12$  bzw.  $85 \pm 6$  mmHg bei Hyperglykämie (15 mmol/l) fest (Marfella et al., 1995).

### **2.7.2. Die diabetische Mikroangiopathie**

Die Mikroangiopathie weist eine multifaktorielle Pathogenese auf. Die geschädigten Gefäße zeigen histologisch eine besonders dünne Wandbeschaffenheit bzw. aufgelockerte Struktur und sehen unausgereiften Gefäßen sehr ähnlich. Dadurch ist eine Anfälligkeit gegenüber hämodynamischen Belastungen und eine vermehrte Durchlässigkeit vorstellbar (Østerby, 1992).

Die Gefäßmembranen sind glykosyliert und verdickt. Sie zeigen eine Änderung in ihrer elektrischen Ladung sowie in ihren Permeationseigenschaften. In den Endothelzellen lassen

sich Sorbitakkumulationen nachweisen. Weiterhin ändert sich die Prostazyklinsynthese und die Lipoproteinlipaseaktivität.

In den Erythrozyten sind Glykosylierungsprodukte nachweisbar. Eine Viskositäts- und Stoffwechseländerung ist nachzuweisen. Auch Thrombozyten zeigen diese Änderungen und zusätzlich eine erhöhte Aggregations- und Adhäsionsneigung (Luft et al., 1992).

### **2.7.3. Die diabetische Retinopathie/Katarakt**

Als häufigste Erkrankungen der Augen bei Typ-1- und Typ-2-Diabetikern werden Linsentrübungen und Netzhautschädigungen festgestellt, welche aufgrund der fehlenden Symptome häufig ein fortgeschrittenes Stadium aufweisen.

Der Schweregrad der diabetischen Retinopathie zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Diabetesdauer. Das Risiko einer Netzhautveränderung bei Typ-1-Diabetikern steigt von 27% nach 5 - 10 Jahren Diabetesdauer auf 90% nach 30 Jahren.

Zwei pathophysiologische Mechanismen liegen der Retinopathie zu Grunde:

1. Gefäßverschlüsse
2. Permeabilitätsstörungen mit daraus folgenden Ödemen.

Die Retinopathie wird in zwei Klassen eingeteilt:

1. Hintergrundretinopathie mit Mikroaneurismen, Punktblutungen, harten Exsudaten, Makulaödemen und cotton-wool-Herden (Nervenfaserschichtinfarkte).

Diese Form scheint seltener und insgesamt gutartig zu verlaufen.

2. Proliferative Retinopathie mit fibrovaskulären Proliferationen, Netzhautablösungen und Neovaskularisationsglaukom (Oldendoerp et al., 1987).

Durch Neueinsprossung von Gefäßen in den Glaskörper kann es zu rezidivierenden Blutungen, Glaskörperschrumpfung und letztendlich zur Netzhautablösung mit daraus resultierender Erblindung kommen.

Die Höhe der AGE-Produkte korreliert mit der Schwere der diabetischen Retinopathie (Brownlee et al., 1988; Ono et al., 1998).

#### **2.7.4. Die diabetische Neuropathie**

Viele Typ-1-Diabetiker zeigen bereits bei der Erstdiagnose reversible Nervenveränderungen. Die Nerven zeigen eine verminderte Leitgeschwindigkeit, die im Zusammenhang mit einem vermehrt ablaufendem Polyolpathway stehen. Dadurch steigt die Konzentration an Sorbit und Fruktose in den Axonen und Schwann'schen Zellen. Es kommt nicht zu einer osmotischen Aufschwemmung, da der Stoffwechsel von Sorbit sehr hoch ist. Jedoch sinkt die Konzentration an Myo-Inositol um etwa ein Viertel. Eine gute Blutzuckereinstellung und eine erhöhte Zufuhr an Inositol mit der Nahrung können diesen Konzentrationsabfall verhindern.

Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Na-K-ATPase)-Aktivität. Der Natriumgradient kann nicht aufrecht erhalten werden. Dadurch kommt es u. a. zu einer Verringerung der Konzentration an Aminosäuren und Kreatin sowie einer Störung im Natrium-Kalzium-Stoffwechsel (Winegard, 1987; Hotta, 1997).

#### **2.7.5. Die diabetische Nephropathie**

Die ersten Beschreibungen der glomerulären Veränderungen datieren auf das Ende des 19. Jahrhunderts (Østerby, 1992). Die Nephropathie ist ein multifaktorieller Vorgang und für fast 50% aller Dialysepatienten verantwortlich (Weir et al., 1998).

Es werden fünf Stadien bei der Nephropathie unterschieden. Meist handelt es sich bei der Erstdiagnose schon um ein fortgeschrittenes Stadium der Nephropathie.

Im ersten Stadium sind die Nieren vergrößert und die glomeruläre Filtrationsrate sowie der renale Plasmafluss sind erhöht. Diese Veränderungen normalisieren sich mit Therapiebeginn (Hasslacher, 1988).

An Ratten wurde gezeigt, dass die Vergrößerung der Niere schon nach 8 - 12 Wochen Diabetesdauer zu beobachten ist. Es konnte eine leichte Albuminurie nachgewiesen werden, jedoch keine glomeruläre Hyperfiltration (Zamlauski-Tucker et al., 1992). Die nichtenzymatische Glykosylierung sowie der MDA-Gehalt in den Glomeruli und in der renalen Cortex sind erhöht. Auch eine vermehrte Konzentration an Immunglobulin G (IgG)



und M (IgM) ist in den glomerulären Mesangialregionen und den Kapillarwänden bei diabetischen Ratten nachweisbar (Tomino et al., 1991).

Choi und Mitarbeiter finden bei diabetischen Ratten signifikant erhöhte Plasma- und Urinspiegel an NO-Produkten. Sie berichten von einer fünffach höheren Ausscheidung an  $\text{NO}^{2-}$  und  $\text{NO}^{3-}$  sowie einem Anstieg der NO-Synthase. Die Normalisierung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Plasmaflusses (RPF) durch Gabe eines NO-Synthasehemmers bestätigte den negativen Einfluss von NO-Produkten auf die Nierenfunktion (Choi et al., 1999).

Der transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF-beta) ist für die renale Zellhyperthrophie und die Produktion von Extrazellulärmatrixmolekülen verantwortlich. Hohe Glukosespiegel erhöhen die Konzentration der TGF-beta-messenger-Ribonukleinsäure (mRNS) und den Proteingehalt in kultivierten proximalen Tubuluszellen sowie glomerulären Epithel- und Mesangialzellen. Wenn TGF-beta-Antikörper gegeben werden, lässt sich bei diabetischen Ratten das Nierengewicht und die glomeruläre Hyperfiltration signifikant senken (Hoffman et al., 1998).

Das zweite Stadium der Nephropathie ist durch unterschiedliche Stoffwechselstörungen der Basalmembran (Typ-IV-Kollagenanteil, Aufbau der Basalmembranmatrix, Heparansulfatgehalt, Höhe der negativen Ladung der Membran) gekennzeichnet. Diese sind histologisch nachweisbar (Hasslacher, 1988). Zusätzlich ist das zweite Stadium durch eine Expansion der Mesangialmatrix (extrazelluläres Material) und eine Verdickung der kapillären, glomerulären und tubulären Basalmembranen ohne erhöhte Zellproliferation gekennzeichnet. Es kommt zu einer glomerulären Fibrose, welche die renalen Filtrationseinheiten zerstört. Ein positiver Zusammenhang zwischen der Mesangialmatrixausdehnung und der Schwere der diabetischen Nephropathie ist nachweisbar (Østerby, 1992; Del Prete et al., 1998; Berg et al., 1998).

Die Arbeitsgruppe Gulman untersuchte die Größe des juxtaglomerulären Apparates. Bei Diabetikern finden sich gegenüber Nichtdiabetikern stark vergrößerte Volumina. Ebenso zeigte sich eine signifikante Vergrößerung des Bereiches der Macula densa bei Diabetikern (Gulman et al., 1998).

Die Basalmembrandicke zeigt schon bei Nichtdiabetikern eine relativ große Schwankungsbreite, doch ist sie bei Diabetikern ohne Mikroalbuminurie durchschnittlich schon so weit vergrößert, dass nur noch einzelne Werte in den Bereich der Nichtdiabetiker fallen. Bei Patienten mit Mikroalbuminurie ist die durchschnittliche Membrandicke bereits deutlich erhöht. Patienten mit Makroalbuminurie zeigen Werte, die nur leicht über denen der Mikroalbuminurie liegen (Østerby, 1992).

Die mesangiale Volumenfraktion pro Glomerulus, die Matrixvolumenfraktion pro Glomerulus und das Matrixstarrvolumen sind erhöht (Østerby et al., 1998).

Die proximale Tubulusmembranweite bei Diabetikern ist gegenüber Nichtdiabetikern statistisch signifikant vergrößert. Eine starke positive Korrelation ergibt sich zwischen der tubulären Membranweite und der glomerulären Basalmembranweite. Beide Werte korrelieren statistisch signifikant mit der Höhe des HbA<sub>1c</sub> (Brito et al., 1998).

McAuliffe und Mitarbeiter berichten von einer gestörten Synthese und einem veränderten Abbau von negativ geladenen Proteoglykanen bei Diabetikern (McAuliffe et al., 1997).

Die Expression von Heparansulfat sowohl in vaskulären (Glomeruli) als auch in avaskulären (Haut) Basalmembranen wird vermindert (van der Pijl et al., 1998). Dadurch kommt es zu einer Abnahme der negativen Ladung der Basalmembran, so dass negativ geladene Proteine (Albumin) leichter passieren können (Hasslacher, 1988). Die Arbeitsgruppe Michels zeigt mit geladenen Dextranen, dass die Veränderung der Membranladung keinen Einfluss auf die Ausscheidung geladener Moleküle hat (Michels et al., 1982). Bei diabetischen Ratten wird im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant größerer Teil des Albumins als Monomer zusammen mit leicht und stark abgebautem Albumin ausgeschieden. Daher scheint die diabetische Niere im Vergleich zur nichtdiabetischen eine Inhibierung des Albuminabbaus auf der postglomerulären Seite aufzuweisen und nicht nur eine Art von „shunt“-Pathway (Burne et al., 1998).

Im dritten Stadium zeigen sich erste Anzeichen einer Kapillarschädigung. Es kommt zur Mikroalbuminurie und zum Blutdruckanstieg (Hasslacher, 1988). Ursache kann der postglomeruläre Widerstand und/oder die Reduktion des präglomerulären Widerstandes sein. Dieser Stress führt zu einer Freisetzung von wachstumsstimulierenden Zytokinen und

fibrotischen Mediatoren. Es kommt zu einer Zellproliferation und einer Matrixakkumulation mit einer Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose (Weir et al., 1998).

Als weitere Einflussfaktoren, insbesondere der glomerulären Hyperfiltration und der Albuminurie, gelten auf zellulärer Ebene in den Glomeruli ein erhöhter Spiegel an Diazylglyzerol (DAG) und eine erhöhte Proteinkinase-C-Aktivität. Diese baut DAG zu Phosphorsäure ab. Die Arbeitsgruppe Koya berichtet bei diabetischen Ratten im Vergleich zu Kontrollratten nach zwei Wochen von um  $106 \pm 17\%$  erhöhten Diazylglyzerolspiegeln und von um  $66 \pm 8\%$  erhöhte Proteinkinase-C-Aktivität (Koya et al., 1997; Koya et al., 1998).

Das vierte Stadium ist durch die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate um 1 ml pro Monat und des renalen Plasmaflusses um 5 ml pro Minute (min) und Monat gekennzeichnet. Bei über der Hälfte der Patienten liegt ein Bluthochdruck vor, und es ist eine persistierende Proteinurie nachweisbar.

Im fünften Stadium hat nahezu jeder Patient einen Bluthochdruck. Zusätzlich zur teilweise massiven Proteinausscheidung steigt der Serum-Kreatininwert an (Hasslacher, 1988).

## **2.8. Einflussfaktoren auf das Fortschreiten der diabetischen Folgeschäden, unter besonderer Berücksichtigung der Nephropathie**

### **2.8.1. Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen eines hohen Blutglukosespiegels**

Als Endprodukte der nichtenzymatischen Glykosylierung entstehen AGE-Produkte. Davon bekannt ist z. B. Pentosidin. Es gibt Hinweise, dass weitere Stoffwechselwege u. a. der Polyolpathway zur Pentosidinbildung führen können. So kann die Gabe eines Aldosereduktasemmers die Pentosidinbildung verhindern.

Das Missverhältnis zwischen Dehydroaskorbat und Ascorbat in der diabetischen Zelle erhöht ebenfalls die Pentosidinkonzentration. Es ist bekannt, dass sie altersabhängig und bei Diabetikern gegenüber Nichtdiabetikern gleichen Alters erhöht ist.

Es zeigt sich keine Korrelation des Pentosidinspiegels zur Diabetesdauer, wohl aber zum Schweregrad der diabetischen Folgeschäden. Werden diese in unterschiedliche Schweregrade

eingeteilt und bewertet, dann ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der Summe der Schweregrade und der Pentosidinkonzentration. Weniger stark ist die Korrelation, wenn der Schweregrad einzelner Folgeschäden betrachtet wird. Da bei Diabetikern mit den schwersten Schäden auch der Pentosidingehalt am höchsten ist, könnte dieser wie das HbA<sub>1c</sub> als langfristiger Parameter der Stoffwechselsituation angesehen werden (Sell et al., 1992).

Viele Daten deuten auf einen starken Zusammenhang zwischen der Höhe der Blutglukose bzw. des HbA<sub>1c</sub> auf die Pathogenese der diabetischen Nephropathie hin. In einer Untersuchung an 54 Typ-1-Diabetikern zeigt die Arbeitsgruppe Earle einen signifikanten, inversen Zusammenhang zwischen der Höhe des glykosylierten Hämoglobins und der Zeit bis zum Auftreten einer Proteinurie auf ( $r = -0,79$ ,  $p < 0,05$ ) (Earle et al., 1997).

Bei 121 Typ-1-Diabetikern finden O'Brien und seine Mitarbeiter eine signifikante positive Korrelation zwischen der Albuminausscheidung bzw. der Ausscheidung an retinolbindendem Protein und dem glykosylierten Hämoglobin ( $p < 0,002$ ) (O'Brien et al., 1996).

Die Arbeitsgruppe Berg fand eine positive Korrelation zwischen der Höhe des HbA<sub>1c</sub> und der Mesangialvolumenfraktion sowie Basalmembrandicke (Berg et al., 1998).

McAuliffe und Mitarbeiter berichten von einer gestörten Synthese und einem gestörten Abbau von negativ geladenen Proteoglykanen bei Diabetikern. Sie zeigen, dass eine Vitamin-C-Zugabe zu einem Kulturmedium für Rattenmesangialzellen die Proteoglykansynthese stimuliert. Eine erhöhte Glukosekonzentration von 25 mmol im Vergleich zu 8 mmol verhindert die Stimulierung (McAuliffe et al., 1997).

Glykosylierte Proteine beeinflussen die Beschaffenheit von glomerulären Epithelzellen. Die Arbeitsgruppe Sing kultiviert Zellen in Medien mit 1% glykiertem fetalem Rinderserum oder 1% nicht glykiertem Serum. In den Medien wird anschließend sowohl die Kollagenaseaktivität bestimmt, als auch die Zellen auf Matrixantigene (Kollagen I, glomeruläre Basalmembranantikörper, Laminin und Fibronectin) und Proteine der tight junctions (Kadherin, desmosomales Protein) untersucht. Zusätzlich wurden Zellen auf Filtermembranen angezüchtet, um sie auf die Durchlässigkeit für Inulin und Albumin zu untersuchen. Bei der Inkubation mit glykiertem Serum gab es einen signifikanten Anstieg der Laminin- (+ 18%) und Basalmembranantigene (+ 33%), während die Kollagen-I- und Fibronectinantigene unverändert blieben. Ebenso änderte sich die Anordnung von Kadherin.

Die Kollagenase-aktivität sank um 45%. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war die Ausscheidung von Inulin um 550% und die von Albumin um 320% erhöht (Singh et al., 1998).

AGE-Produkte stören den normalen Basalmembranstoffwechsel. So erhöhen sie die Bindung von LDL und Albumin. Zusätzlich werden IGG-Antikörper etwa 5-mal stärker gebunden. Bei Anwesenheit von AGE-Produkten kann eine vermehrte Bildung von cross-links auf dem Typ-IV-Kollagen der Basalmembran nachgewiesen werden. Die Bildung anderer Basalmembrankomponenten wird ebenfalls negativ verändert (Laminin, Heparansulfat, Proteoglykan). Zusätzlich soll der normale Aufbau der Membranporen behindert werden (Brownlee et al., 1988).

Die Arbeitsgruppe Berg findet bei jungen Typ-2-Diabetikern in einer dreijährigen Studie, dass die Höhe des Serum-AGE-Levels statistisch signifikant mit der Basalmembrandicke und der Matrix-Glomerularvolumenfraktion korreliert (Berg et al., 1997).

### **2.8.2. Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der Proteinzufuhr**

Bei diabetischen Ratten kann gezeigt werden, dass eine erhöhte Nahrungsproteinzufuhr (24% gegenüber 8%) zu einer signifikant erhöhten Albuminausscheidung und Kreatininclearance führt (Copeland et al., 1989). In klinischen Studien und Metaanalysen zeigt sich ein positiver Einfluss einer Proteinrestriktion auf den Verlauf der Nephropathie (gemessen als glomeruläre Filtrationsrate). Werden die Studien gepoolt, zeigt sich nur noch ein relativ kleiner Effekt auf die GFR (etwa 0,5 ml/min/Jahr), der jedoch bei längerer Beobachtungsdauer größer wird (Kasiske et al., 1998). Walser und Mitarbeiter zeigen, dass eine sehr niedrige Proteinzufuhr von 0,3 g/kg KG sowohl bei diabetischen als auch nichtdiabetischen Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion den Zeitpunkt einer Nierenersatztherapie um 1 Jahr verzögern kann (Walser et al., 1999). Die Arbeitsgruppe Hansen berichtet im gleichen Jahr, dass eine Reduzierung des Nahrungsproteins von 1 g/kg KG auf 0,6 g/kg KG die Albuminausscheidung um fast 30% senken kann. Erhöht sich die Aufnahme wieder, so steigt die Albuminausscheidung ebenfalls an (Hansen et al., 1999).

Die Proteinquelle scheint dabei ohne Bedeutung zu sein. Der Einsatz von Sojaprotein zeigt keinen weiteren Einfluss auf die Nierenfunktion (Anderson et al., 1998).

### **2.8.3. Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen des Blutdruckes**

In Tiermodellen zeigt sich, dass der erhöhte präglomeruläre und postglomeruläre Kapillarwiderstand schädigend auf die Glomeruli wirken kann. Klinische Studien am Menschen zeigen einen negativen Einfluss des erhöhten Blutdruckes auf hämodynamische Parameter, die Albuminausscheidung und das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie (Bauer, 1998). Die Arbeitsgruppe Earl errechnet, dass eine Steigerung des Blutdruckes pro 10 mmHg die Zeit bis zum Auftreten einer Proteinurie um jeweils 1,9 Jahre verkürzt (Earle et al., 1997).

Weir und Mitarbeiter folgern aus klinischen Studien, dass für einen optimalen Schutz der Nierenfunktion der Blutdruck auf Werte von 125/75 mmHg statt bisher 140/90 mmHg gesenkt werden sollte (Weir et al., 1998).

Die Arbeitsgruppe um Bakris zeigt, dass eine blutdrucksenkende Kombinationstherapie synergistische Effekte zeigen kann. Senkt die Monotherapie mit einem Kalziumantagonisten bzw. einem angiotensin-converting-enzyme-hemmer (ACE-Hemmer) die Proteinurie um etwa 30%, kann diese mit einer Kombinationstherapie um 62% gesenkt werden (Bakris et al., 1998).

Ruggeneti und Mitarbeiter weisen darauf hin, dass von den Einflussfaktoren Blutdruck, Bz, Serumkreatinin und Proteinurie auf das Nierenversagen, nur die Proteinurie eine signifikante Aussage auf das Fortschreiten der Nephropathie zulässt (Ruggeneti et al., 1998).

#### **2.8.4. Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der körperlichen Aktivität**

Die Arbeitsgruppe Hidaka untersucht, welche endogenen Proteine (Albumin, IgG, IgG4 und  $\beta$ -2-Mikroglobulin) durch körperliche Aktivität vermehrt ausgeschieden werden. In der Gruppe der Typ-2-Diabetiker erhöht sich durch die Bewegung die Ausscheidung an Albumin, IgG4 und  $\beta$ -2-Mikroglobulin (Hidaka et al., 1998).

#### **2.8.5. Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der Gravidität**

In einer Studie von Diglas und Mitarbeitern wird untersucht, ob sich eine Schwangerschaft auf die Albuminausscheidung von normoalbuminurischen Typ-1-Diabetikerinnen und Nichtdiabetikerinnen auswirkt. In der sechzehnten Schwangerschaftswoche ist die Albuminausscheidung der Diabetikerinnen gegenüber den Nichtdiabetikerinnen doppelt so hoch (5 Mikrogramm pro Minute ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ) bzw.  $2,4 \mu\text{g}/\text{min}$ ), ohne statistisch signifikant zu werden. Die Albuminausscheidung der Diabetikerinnen steigt in der 38. Schwangerschaftswoche im Vergleich zur 16. nicht signifikant an, unterscheidet sich jedoch signifikant von den Nichtdiabetikerinnen (Diglas et al., 1997).

#### **2.8.6. Die diabetische Nephropathie, Auswirkungen der atherosklerotischen Veränderungen**

In einer Studie von Taniwaki und Mitarbeitern an 61 Typ-2-Diabetikern wird ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Abnahme der glomerulären Filtrationsrate und der Dicke der carotis intima media sowie der Karotisverkalkung und dem renalen arteriellen Widerstandsindex gefunden (Taniwaki et al., 1998).

## 2.9. Studien, die einen Hinweis auf den Einfluss von Radikalen oder Antioxidantien auf die diabetischen Folgeschäden geben

### 2.9.1. Der Einfluss von Radikalen

Sauerstoffradikale (z. B.: Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) entstehen bei enzymatischen oder metallkatalysierten Reaktionen. Diese reagieren mit umliegenden Molekülen. Dazu zählen neben Proteinen und Lipiden auch die DNS. Als Folge davon können Schädigungen wie Fragmentierungen und cross-links entstehen.

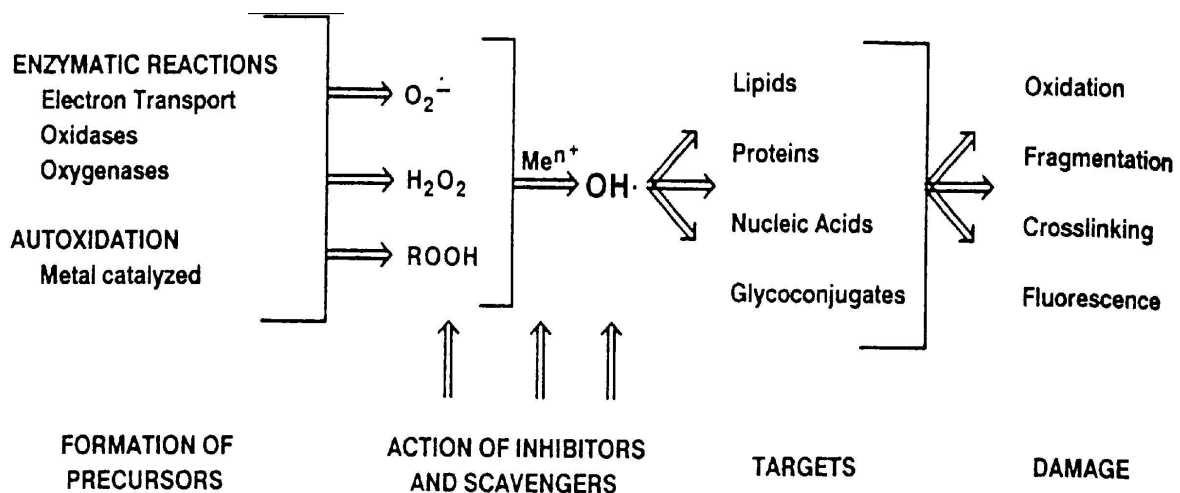


Abb. 16: Radikale und Ihre Auswirkungen auf biologische Strukturen (Baynes, 1991)

Die bisherigen Daten zeigen, dass oxidative Schäden nur durch physiologische, katabole Prozesse rückgängig gemacht werden können. Bei langlebigen Proteinen (Kristallin, Kollagen, Elastin oder Laminin) kann es zu einer Akkumulation von oxidativen Schäden und einer Änderung der Abbaurate kommen. Diese können langfristig zu pathologischen Veränderungen führen.

Für den direkten Nachweis von oxidativen Vorgängen steht bisher kein Routineverfahren zur Verfügung. Entweder sind die entstehenden Radikale nur sehr kurzlebig oder die komplexe Struktur der Reaktionen und Produkte ist nicht vollständig bekannt. Teilweise sind die



entstehenden Produkte nicht von physiologischen Strukturen zu unterscheiden. Beispielsweise ist es nicht möglich, das während der oxidativen Veränderung von Histidin entstehende Aspartat von der natürlich vorkommenden Aminosäure zu unterscheiden. Ein weiteres Problem stellt die Festlegung von Normalbereichen dar.

Zum indirekten Nachweis radikalischer Reaktionen werden deshalb Produkte der nicht enzymatischen Glykosylierung und aus den Maillardreaktionen (z. B. Carboxymethyl-[hydroxy]lysin oder Pentosidin) benutzt. Es ist bekannt, dass sich die Maillardreaktionen durch Zugabe von Sauerstoff und/oder Metallionen beschleunigen und durch Sauerstoffausschluss, Metallchelatoren oder Radikalscavenger verlangsamen lässt (Baynes, 1991).

Ebenso kann die Zugabe von MDA, Wasserstoffperoxid oder tertiärem Butylhydroperoxid die erwartete Konzentration an GHb signifikant erhöhen (Jain et al., 1997).

Nicht in jedem Fall steht die nachgewiesene Substanz mit den Folgeschäden in kausalem Zusammenhang. So ist zwar eine erhöhte Pentosidinkonzentration im Kollagen von Diabetikern nachzuweisen, doch kann sie aufgrund der niedrigen Konzentration nicht mit Folgeschäden in Verbindung gebracht werden (Baynes, 1991). Trotzdem ist das Pentosidin ein guter Parameter zur Einschätzung der Stoffwechsellaage von Diabetikern, da er mit der Schwere der diabetischen Folgeschäden korreliert (Sell et al., 1992).

Die Arbeitsgruppe Lee nennt als weiteren Faktor den Polyolpathway, da durch ihn der NADH-Spiegel sinkt. Dadurch fehlt es zur Regeneration von Antioxidantien durch die Glutathionreduktase (Lee et al., 1999).

Radikale werden als Ursache der Entstehung der diabetischen Angiopathien diskutiert (Rösen et al., 1991). Die Glukoseautoxidation, der Polyolpathway und die Proteinglykosylierung werden als Quelle von Radikalen genannt. Zusätzlich ist die Expression von antioxidativen Enzymen (Kupfer-Zink-SOD, Glutathionperoxidase, Katalase) in Endothelzellen erhöht (Ceriello et al., 1996).

Werden Endothelzellen einer hohen Glukosekonzentration ausgesetzt, entstehen vermehrt Superoxidanionen, die die vasodilatatorisch wirkende NO-Produktion vermindern können (Giugliano et al., 1996). Die Thrombozyten produzieren verstärkt  $\text{TxA}_2$ , das vasokonstriktorisches und aggregationsfördernd wirkt. Zusätzlich ist die Synthese von

12-Hydroperoxyeikosatriensäure erhöht, welches chemotaktisch auf glatte Muskelzellen wirkt. Diese können in die Intima wandern und proliferieren. Es entsteht eine Vorstufe atherosklerotischer Plaques (Rösen et al., 1991).

Die Gabe von Antioxidantien kann die bei Hyperglykämie reduzierte endothelabhängige Relaxation und verzögerte Zellreplikation rückgängig machen (Giugliano et al., 1996; Ceriello et al., 1996).

### **2.9.2. Der Einfluss von Antioxidantien**

Neben der Möglichkeit, die Entstehung von Radikalen zu vermindern, kann die antioxidative Abwehr verstärkt werden.

#### **2.9.2.1. Das Glutathion**

Glutathion ist ein Bestandteil des antioxidativen Enzymsystems (Glutathionperoxidase). Es ist das in wässrigen Kompartimenten in höchster Konzentration vorliegende Antioxidans (Thomas, 1999).

Durch die Gabe von Glutathion (600 mg intra venös (i.v.) und anschließender Infusion 5 mg/min) können die durch Hyperglykämie ausgelösten hämodynamischen Veränderungen vollständig verhindert werden (Marfella et al., 1995).

Bei der diabetischen Neuropathie im Rattenmodell verhindert eine frühzeitige Gabe von Glutathion die Veränderungen der Nervenleitgeschwindigkeit. Selbst eine späte Therapie verbessert die Situation noch (Bravenboer et al., 1992).

### **2.9.2.2. Das Vitamin E**

Wird bei Diabetikern eine Lipidperoxidation durch die Gabe von NADPH oder Peroxidzugabe forciert, so erhöht sich als Zeichen des oxidativen Stresses der Gehalt an MDA. Wird zusätzlich zu den Oxidantien Vitamin E gegeben, lässt sich der MDA-Spiegel fast auf Normalniveau senken. (Rao et al., 1992).

#### **2.9.2.2.1. Der Einfluss auf die nichtenzymatischen Glykierungsprozesse**

Einen indirekten Einfluss von Vitamin E auf die nichtenzymatischen Glykosylierungsprozesse beschreiben Paolisso und Mitarbeiter. Sie zeigen, dass die Vitamingabe die Insulinwirkung sowohl bei Nichtdiabetikern als auch bei Typ-2-Diabetikern verbessert. Die Verabreichung von Vitamin E (900 mg) über einen Zeitraum von 4 Monaten konnte die Fläche unter der Glukosekurve nach einem Glukosetoleranztest bei Nichtdiabetikern um 20% und bei Diabetikern um 10% senken (Paolisso et al., 1993).

In der ersten von zwei Studien der Arbeitsgruppe Bierenbaum wird diabetischen Patienten über einen Zeitraum von zwei Wochen Vitamin E in einer Menge von 2.000 IE pro Tag gegeben. In dieser Zeit fiel der durchschnittliche Blutglukosespiegel der Patienten signifikant. In der zweiten Studie wird der Zeitraum auf sechs Wochen mit der gleichen Vitamin-E-Dosierung ausgeweitet und anschließend mit einer sechswöchigen Placebokontrollphase abgeschlossen. Der durchschnittliche Bz sank dabei statistisch signifikant nach 6 Wochen Vitamin-E-Gabe. Nach 6 Wochen Placebophase stieg er an. Es traten während der Vitamin-E-Supplementierung keine Nebenwirkungen auf (Bierenbaum et al., 1985).

Auch die tägliche Gabe von 900 mg Tokopherol über 3 Monate in einer doppelblind placebokontrollierten Crossoverstudie an 25 Typ-2-Diabetikern zeigt eine Senkung des Blutzuckerspiegels von anfänglich 8,3 mmol auf 7,5 mmol. Dadurch sinkt der Anteil des HbA<sub>1c</sub> von 7,8% auf 7,1% (Paolisso et al., 1993).

Die Arbeitsgruppe Jain untersucht in einer doppelblind, placebokontrollierten Studie den Einfluss einer moderaten Vitamin-E-Dosierung von 100 IE/d auf die Höhe des glykierten

Hämoglobins bei 35 Typ-1-Diabetikern. Es wird sowohl der Nüchternblutzucker als auch der GHb-Wert bei beiden Gruppen zu Beginn und am Ende des Untersuchungszeitraums bestimmt. Bei der Placebogruppe ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Messwerten (GHb, Glukosespiegel und Triglyzeride) zu Beginn und zum Ende der Studie. Bei der Verumgruppe zeigten sich folgende Veränderungen :

1. Der GHb-Spiegel sank signifikant von durchschnittlich  $12,8 \pm 0,9\%$  auf  $11,5 \pm 0,4\%$ .
2. Der Blutzucker sank signifikant von  $11,6 \pm 1,3$  mmol auf  $8,8 \pm 1,2$  mmol
3. Die TG sanken signifikant von  $2,9 \pm 0,3$  mmol auf  $2,2 \pm 0,2$  mmol (Jain et al., 1996).

Ein ähnlicher Befund wird von der Arbeitsgruppe Ozden im Tierversuch beschrieben. Sie teilen ein Rattenkollektiv in 4 Gruppen auf.

1. Die Kontrollgruppe hat keinen Diabetes und erhält kein Vitamin E.
2. Die zweite Gruppe ist diabetisch und erhält kein Vitamin E.
3. Die dritte Gruppe ist diabetisch und erhält 500 mg/kg KG Vitamin E intra peritoneal (i. p.).
4. Die vierte Gruppe ist diabetisch und erhält 1.000 mg/kg KG i. p. Vitamin E.

Die Vitamin-E-Injektionen erfolgen alle drei Tage. Das Vitamin E hat keinen Einfluss auf den Gewichtsverlust und die Blutglukosekontrolle. Der Anteil des glykosylierten Hb unter hoher Vitamin-E-Gabe sinkt im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 30% (Ozden et al., 1989).

Den positiven Einfluss von Vitamin E auf die Höhe des HbA<sub>1c</sub> bestätigt eine Studie, in der über einen Zeitraum von 2 Monaten entweder ein Placebo, Vitamin E in einer Dosierung von 600 mg/d oder 1.200 mg/d gegeben wird. Der durchschnittliche Bz-Spiegel bleibt während der Versuchsperiode unverändert. Der Anteil des stabilen HbA<sub>1c</sub> sinkt unter der Gabe von Vitamin E wie folgt (Placebo / Vitamin E 600 mg / Vitamin E 1.200 mg):

1. Beginn:  $11,6\%$  /  $11,5\%$  /  $11,8\%$
2. Nach 1 Monat:  $11,5\%$  /  $11,0\%$  /  $10,6\%$
3. Nach 2 Monaten:  $11,4\%$  /  $8,9\%$  /  $7,8\%$  (Ceriello et al., 1991).

In einer dreimonatigen Untersuchung mit 80 Patienten kann die tägliche Zufuhr von 1.200 IE Vitamin E den HbA<sub>1c</sub>-Wert von 6,6% auf 6,4% senken (Kähler et al., 1993).

Die Gabe von Vitamin E kann einen durch Wasserstoffperoxid induzierten erhöhten GHb-Anteil in Erythrozyten verhindern. Ebenso wird die ohne Vitamin-E-Gabe beobachtete MDA-Bildung, welche schon alleine zu einer Erhöhung des GHb führt, inhibiert (Jain et al., 1997).

Im Gegensatz dazu kann die Arbeitsgruppe Reaven bei 21 Männern mit Typ-2-Diabetes bei einer Gabe von 1.600 IE Vitamin E pro Tag in einer placebokontrollierten Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Glykosylierung (Hämoglobin, Albumin, Gesamtplasmaproteine, LDL) finden. Der Anteil des HbA<sub>1c</sub> lag zwischen 6 und 10% (Reaven et al., 1995).

Aoki und Mitarbeiter berichten von einer teilweisen Hemmung der AGE-Produktbildung durch Vitamin E bei diabetischen Ratten. In dieser Untersuchung zeigt sich ebenfalls eine Hemmung der Bildung TBA-reaktiver-Produkte (Aoki et al., 1992).

#### **2.9.2.2.2. Der Einfluss auf die Angiopathie**

Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt einen positiven Einfluss von Vitamin E auf verschiedene Mechanismen der Pathogenese der Atherosklerose.

- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| - increased antioxidative potential (Patients): | Dembinska-Kiecz et al. 1985 |
| - Desactivation of platelets:                   |                             |
| inhibition of TXA <sub>2</sub> :                | Karpen et al. 1982, 1985    |
|   | Gisinger et al. 1989, 1990  |
| inhibition of MDA:                              | Gisinger et al. 1988, 1990  |
| inhibition of adhesion:                         | Colette et al. 1988         |
| inhibition of aggregation:                      | Jandak et al. 1988, 1989    |
| - increased synthesis of prostacyclin:          | Szczeklik et al. 1985       |
|   | Karpen et al. 1982          |
| - inhibition of glycosylation:                  | Ceriello et al. 1988        |
|   | Agadzhanov et al. 1988      |

- inhibition of lipid peroxidation : Pritchard et al. 1986  
Mamedgasanov et al. 1989
- inhibition of cataracts: Creighton et al. 1985  
(Rösen et al., 1991)

Die Arbeitsgruppe Kunisaki zeigt, dass die Produktion von Prostacyklinen bei einer hyperglykämischen Stoffwechsellaage (Bz: 300 mg/dl) gegenüber einer normoglykämischen sinkt. Durch die Zugabe von Vitamin E normalisiert sich die Produktion, wobei nur die natürliche Vitamin-E-Form wirksam ist (Kunisaki et al., 1992).

Einen indirekten Einfluss von Vitamin E auf die diabetische Angiopathie liefert die Untersuchung von Paolisso und Mitarbeitern. Sie finden in einer placebokontrollierten doppelblinden Crossoverstudie mit 25 Typ-2-Patienten, dass die Gabe von 900 mg Tokopherol Risikofaktoren der Atherosklerose senken kann. Der Triglyzeridspiegel nimmt von anfangs 2,3 mmol auf 1,7 mmol ab, der Cholesterinspiegel sinkt von 6,7 mmol auf 5,5 mmol und der LDL-Spiegel sinkt von 4,7 mmol auf 3,7 mmol (Paolisso et al., 1993).

Durch die Gabe von 1.600 IE Vitamin E pro Tag kann bei 21 Männern mit Typ-2-Diabetes die Oxidationsempfindlichkeit von LDL gesenkt werden. Die Verzögerungszeit bis zum Einsetzen oxidativer Veränderungen erhöht sich innerhalb von 10 Wochen von durchschnittlich 151 min auf 243 min ( $p < 0,01$ ). Die MDA Konzentration sinkt von anfänglich 66 nmol/mg LDL auf 24 nmol/mg LDL (Reaven et al., 1995).

Trotzdem kann in der mit über 20.000 Diabetikern groß angelegten heart protection study keine positive Wirkung einer Vitaminsupplementierung (C, E,  $\beta$ -Karotin) auf die 5 Jahres-Mortalität nachgewiesen werden (Ohne Autor, 2002).

### 2.9.2.2.3. Der Einfluss auf die Nephropathie

Bei der Inkubation von Mesangialzellen über einen Zeitraum von 24 - 72 Stunden (h) wird bei erhöhter Glukosekonzentrationen eine zeitabhängige NO-Konzentrationsabnahme von bis zu 14% gemessen. Es gibt keine Abnahme in der Menge der expremierten NO-Synthase. Stattdessen zeigt sich ein zeitabhängiger Rückgang der Argininkonzentration in den Zellen. Eine Zugabe von Arginin in Höhe von 10 - 20 mmol normalisiert die NO-Produktion dosisabhängig (Trachtman et al., 1997).

Die Arbeitsgruppe Douillet setzt Gruppen von Ratten auf Diäten mit unterschiedlichem Selen-und/oder Vitamin-E-Gehalt. Nach 24 Wochen zeigen alle supplementierten Gruppen im Vergleich zu den nicht supplementierten eine signifikante Verbesserung der renalen Hyperfiltration und der Schwere der glomerulären Läsionen (Douillet et al., 1996).

200 mg Vitamin E pro kg KG und Tag senken den zweifachen Anstieg des glomerulären Volumens bei diabetischen Ratten (Craven et al., 1997).

Bierenbaum und Mitarbeiter untersuchen den Einfluss von täglich 2.000 IE Vitamin E auf den Blutdruck. Sie finden nach 6 Wochen eine statistisch signifikante Senkung des Druckes von 141/85 mmHg zu Beginn der Studie auf 134/78 mmHg (Bierenbaum et al., 1985)

Einen positiven Einfluss auf die Protein- und Albuminurie bei Diabetikern kann die Arbeitsgruppe Kähler bei 80 Diabetikern unter der Supplementierung mit 1.200 IE Vitamin E feststellen. Die Proteinurie sinkt in einem Zeitraum von 3 Monaten von  $740 \pm 880$  mg/l auf  $330 \pm 360$  mg/l und die Albuminurie von  $174 \pm 157$  auf  $87 \pm 148$  mg/24h. Mit  $\alpha$ -Liponsäure und Selen kann ebenfalls eine Verbesserung der Proteinurie erzielt werden (Kähler et al., 1993).

### **2.9.2.3. Das Vitamin C**

#### **2.9.2.3.1. Der Einfluss auf die nichtenzymatischen Glykierungsprozesse**

Die Arbeitsgruppe Stolba inkubiert Albumin entweder mit Glukose (25 mmol/l) oder mit Glukose und 1 mmol/l Askorbat bzw. Dehydroaskorbat. Durch die Zugabe von Askorbat sinkt der Fruktosaminspiegel um etwa 20%, während er bei Zusatz von Dehydroaskorbat um nahezu 20% ansteigt (Stolba et al., 1987).

In einer weiteren Studie inkubieren sie unterschiedliche Kollagentypen mit einer steigenden Glukosekonzentration (10 - 200 mmol/l) und einer steigenden Vitamin-C-Konzentration (0,1 - 1 mmol/l) über einen Zeitraum von 5 Tagen und einem pH-Wert von 7,4. Es zeigt sich, dass die Glykosylierung des Kollagens durch die Zugabe von Ascorbinsäure um bis zu 30% reduziert werden kann. Die Addition von Dehydroaskorbat hingegen erhöht die Glykosylierung um 2 - 14% (Stolba et al., 1988).

Davie und Mitarbeiter untersuchen bei Nichtdiabetikern den Einfluss einer Supplementierung von 1 g Vitamin C pro Tag über einen Zeitraum von 3 Monaten auf u. a. den Blutzucker, das GHb und das glykosylierte Albumin. Der Blutglukosespiegel bleibt unverändert. Der GHb-Anteil bei affinitätschromatographischer Messung zeigt nach 3 Monaten einen Abfall von 6,2% auf 5,1%. Ebenso sinkt der Anteil des glykosylierten Albumins von 1,6% auf 1,0%. Jedoch steigt der Anteil an HbA<sub>1c</sub>, das elektrophoretisch bestimmt wird, von 6,2% auf 7,2%. Die Autoren führen diesen Unterschied zwischen chromatographischer und elektrophoretischer Messung darauf zurück, dass Vitamin C wie Glukose mit Hämoglobin reagiert und die Ladung des Hämoglobins verändert. Es kommt dabei nicht zu einer Strukturveränderung. Dadurch erhöht sich der elektrophoretisch messbare Anteil, jedoch nicht der chromatographisch messbare (Davie et al., 1992).

In einer 90 Tage dauernden Studie an 56 Diabetikern finden Eriksson und Kohvakka bei der Gabe von 2 g Vitamin C pro Tag, dass der Nüchternblutzucker von 10 mmol/l auf 9 mmol/l sinkt. Dementsprechend sinkt der Anteil an HbA<sub>1c</sub> innerhalb der 90 Tage von anfangs 9,3% auf 8,5% (Eriksson et al., 1995).



#### **2.9.2.3.2. Der Einfluss auf die Nephropathie**

McAuliffe und Mitarbeiter finden bei Diabetikern eine Vergrößerung des glomerulären Mesangiums. Weiterhin sind die Synthese und der Abbau von negativ geladenen Proteoglykanen gestört. Sie zeigen, dass eine Vitamin-C-Gabe zu einem Kulturmedium für Rattenmesangialzellen die Proteoglykansynthese stimuliert (McAuliffe et al., 1997).

Einen positiven Einfluss von Vitamin C auf verschiedene Parameter der diabetischen Nephropathie misst die Arbeitsgruppe Craven. Eine tägliche Vitamin-C-Gabe von 10 g/kg KG senkt signifikant das Nierengewicht bei diabetischen Ratten im Gegensatz zu den nichtdiabetischen Ratten. Zusätzlich wird der 2,5-fache Anstieg der TGF- $\beta$  Konzentration und der Anstieg des glomerulären Volumens verhindert. Auch ein 7-facher Anstieg der Albumin clearance kann durch die Vitamin-C-Gabe verhindert werden (Craven et al., 1997).

#### **2.9.2.3.3. Der Einfluss auf die Retinopathie**

In einer Studie von Sinclair und Mitarbeitern wird der Einfluss der Konzentration an freien Radikalen auf den Vitamin-C-Stoffwechsel untersucht. Dazu unterteilen sie das Probandenkollektiv in drei Gruppen. Die erste Gruppe besteht aus Nichtdiabetikern, die zweite aus Diabetikern mit Retinopathie und die dritte aus Diabetikern ohne Retinopathie. Zwischen den Gruppen können keine Unterschiede in der Konzentration der TBA-reaktiven Substanzen, der GSH-Konzentration und der Konzentration an konjugierten Dienen festgestellt werden. Außerdem kann kein Zusammenhang zwischen der GSH-Menge und der Konzentration an konjugierten Dienen gemessen werden. Die Konzentrationen an Ascorbinsäure und Dehydroaskorbat zeigen keine Korrelation zum Blutzucker oder zu Fruktosamin. Trotzdem wird bei dem diabetischen Kollektiv mit Retinopathie im Gegensatz zu den anderen Gruppen ein signifikant erniedrigter Askorbat- und ein signifikant erhöhter Dehydroaskorbatspiegel gemessen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei

Diabetikern der erhöhte oxidative Stress nicht unbedingt im Plasma, sondern in den Zellen nachweisbar ist (Sinclair et al., 1992).

#### **2.9.2.3.4. Der Einfluss auf den Lipidstoffwechsel**

Den Einfluss von 2 g Ascorbinsäure auf den TG- und Cholesterinspiegel über einen Zeitraum von 90 Tagen untersuchen Eriksson und Kohvakka. Sie zeigen, dass sich der Cholesterinspiegel bei Diabetes-Typ-2-Patienten innerhalb von 90 Tagen statistisch signifikant von 6,2 mmol/l auf 5,9 mmol/l ( $p < 0,05$ ) und der Triglyzeridspiegel von 2,5 mmol/l auf 2,2 mmol/l senkt (Eriksson et al., 1995).

### **2.10. Die Proteinkinase-C-Familie**

In den vorangegangenen Kapiteln ist eine Vielzahl mikrozellulärer Stoffwechselstörungen vorgestellt worden. Allerdings lassen sich damit nicht alle diabetischen Komplikationen erklären. In den vergangenen 5 Jahren zeigen etwa 6.000 Veröffentlichungen über die Proteinkinase-C-Familie einen weiteren Ansatzpunkt zu deren Verständnis. Dieser neue Aspekt vermag eine Reihe klinischer Beobachtungen ohne bisherigen kausalen Zusammenhang zu erklären. Die Proteinkinasen-C bestehen aus zahlreichen Isoenzymen mit vielfältigen Aufgaben auf zellulärer Ebene. Aktiviert werden die Kinasen durch Diazylglyzerol.

Sie katalysieren u. a. die Zellproliferation und Differenzierung, üben einen Einfluss auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel aus und beeinflussen die Kontraktion glatter Muskelzellen und die Genexpression. Zusätzlich sind sie in den NO-Stoffwechsel und damit die Endothelfunktion involviert (Thomkin, 2001).

Die Arbeitsgruppe Tarda untersucht die Wirkung von Vitamin E auf die diabetische Nephropathie im Bereich der Mesangialzellen. Sie vermuten, dass in diesem Bereich eine hyperglykämische Stoffwechsellaage zu Funktionsstörungen führt. Die Inkubation der

Mesangialzellen in einem Medium mit 33 mmol/l Glukose erhöht die Lipidperoxidspiegel, stört die Zellreplikation und erhöht die Diazylglyzerolkonzentration sowie die Fibronektinproduktion. In einem weiteren Experiment ermitteln sie einen optimalen oxidativen Schutz durch Vitamin E. Eine Vitaminkonzentration von 100  $\mu$ mol/l erweist sich als wirksamster Schutz. Es zeigt sich weiterhin, dass die Erhöhung der Lipidperoxidkonzentration verhindert, der Diazylglyzerolspiegel und damit die Proteinkinase-C-Aktivität gesenkt und die Fibronektinsynthese auf Normalniveau gehalten werden kann (Tada et al., 1997).

Im gleichen Jahr findet die Arbeitsgruppe Koya bei diabetischen Ratten einen um  $106 \pm 17\%$  erhöhten Diazylglyzerolspiegel und eine um  $66 \pm 8\%$  erhöhte PKC-Aktivität. Durch eine Vitamin-E-Injektion (40 mg/kg KG) i. p. lassen sich diese Veränderungen verhindern.

Die glomeruläre Filtrationsrate ist bei diabetischen Ratten mit  $5 \pm 0,3$  ml/min gegenüber  $2,9 \pm 0,1$  ml/min bei der Kontrolle deutlich erhöht. Die Filtrationsrate der diabetischen Ratten kann durch die Vitamin-E-Gabe auf  $3 \pm 0,1$  ml/min gesenkt werden.

Die Albuminausscheidung erhöht sich durch den Diabetes auf  $9 \pm 2$  mg/d im Vergleich zu  $1 \pm 0,3$  mg/d bei den nichtdiabetischen Ratten. Unter der Vitaminzufuhr geht die Albuminausscheidung auf  $2,4 \pm 0,6$  mg/d zurück.

Um den Mechanismus der Beeinflussung durch Vitamin E zu klären, wird die Aktivitätssteigerung und die synthetisierte Menge an PKC gemessen. Dabei zeigt die Vitamin-E-Gabe sowohl bei nichtdiabetischen als auch bei diabetischen Ratten eine über 20%ige Aktivitätsminderung. Es werden keine Unterschiede in der synthetisierten Proteinmenge festgestellt. Daher wird vermutet, dass der Effekt des Vitamin E in der Aktivitätsmodulierung der Kinase selbst liegt (Koya et al. 1997, Koya et al., 1998).

Die Arbeitsgruppe Idris bestätigt diese Vermutung. Als kausaler Mechanismus ist mittlerweile bekannt, dass Tokopherol die Diazylglyzerolkinase stimuliert. Dadurch sinkt die Konzentration an DAG und damit die Aktivität der PKC. Eine hochdosierte Vitamin-E-Gabe zeigt bereits eine moderate Verbesserung der retinalen Mikroperfusion. In Zukunft ist zu erwarten, dass mit der Klasse der PKC-Inhibitoren ein neues Kapitel in der Behandlung des Diabetes mellitus geschrieben wird (Idris et al., 2001).

Forst berichtet von Studien, die den Einsatz von spezifischen PKC-Inhibitoren testen. Damit sollen durch PKC verursachte Störungen (NO-Produktionssenkung oder -Steigerung des oxidativen Stresses) verhindert werden und potentere Inhibitoren als das bisher bekannte Vitamin E entwickelt werden (Forst, 2001).

### 3. Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv besteht aus 2 Typ-1- und 10 Typ-2-Diabetikern mit gesicherter Nephropathie. Dazu muss die Albuminausscheidung nach positivem Vorbefund in einem Zeitraum von 2 Monaten an drei Tagen größer als 30 mg/24h sein.

In der folgenden Tabelle sind die Daten der Teilnehmer zusammengefasst.

		Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Anzahl	12	4	8	10
Alter	54 +/- 11	53 +/- 8	50 +/- 10	52 +/- 12
Gewicht	78 +/- 8	77 +/- 5	75 +/- 7	78 +/- 9
Größe	175 +/- 7	173 +/- 9	175 +/- 7	175 +/- 6
BMI	26 +/- 3	26 +/- 4	25 +/- 3	26 +/- 3
Geschlecht	8 m / 4 w	2 m / 2 w	5 m / 3 w	6 m / 4 w
Typ	2 Typ1 / 10 Typ2	1 Typ1 / 3 Typ2	2 Typ1 / 6 Typ2	2 Typ1 / 8 Typ2

Das Kollektiv wird in Gruppen aufgeteilt, die an dem unter Punkt 3.2. beschriebenen Studienprotokoll wie folgt teilnehmen:

Gruppe A: 4 Probanden, die Phase 1 - 5 durchlaufen

Gruppe B: Gruppe A + weitere 4 Probanden, die an den Phasen 1 - 4 teilnehmen.

Gruppe C: Gruppe A + B + zwei weitere Probanden, die an den Phasen 1 - 4 teilnehmen. Die Probanden mit der höchsten und niedrigsten Albuminausscheidung sind herausgenommen. Mit dieser Gruppe soll überprüft werden, ob der große Standardfehler eine Signifikanz verdecken kann.

### 3.2. Versuchsaufbau

Die Studie kann aufgrund der geringen Probandenzahl nicht randomisiert und placebokontrolliert werden. Stattdessen bilden die Probanden ihre eigene Kontrolle.

Für die Studie werden folgende Vitaminpräparate verwendet:

- Vitamin E: Mowivit Vitamin-E-600-Kapseln der Firma Rodisma Pharm
- Vitamin C: Vitamin-C-500-mg-Lutschtablette der Firma BASF

Um den Einfluss der antioxidativen Vitamine E und C auf die diabetische Nephropathie klären zu können, wird folgendes Versuchsprotokoll gewählt:

#### 1. Phase: Basiswertermittlung

In einem Zeitraum von 4 Wochen werden an 3 Terminen die Basiswerte ermittelt. Auf eine Auswaschphase kann verzichtet werden, da keiner der Patienten zuvor Vitaminpräparate einnahm,.

Nur Patienten, die an den drei Terminen eine Albuminausscheidung größer als 30 mg/24h aufweisen, werden in die Studie aufgenommen.

#### 2. Phase: Vitamin-E-Supplementierung

In der 2. Phase wird den Patienten ein Vitamin E Präparat in einer Dosierung von 400 mg D- $\alpha$ -Tokopherolazetat (entspricht 600 IE) 2-mal täglich zu den Mahlzeiten gegeben. Die Patienten erscheinen über einen Zeitraum von 16 Wochen alle 4 Wochen zur Urinabgabe und Blutabnahme in der Klinik.

#### 3. Phase: - Vitamin-E- und Vitamin-C-Supplementierung

Während der 4-monatigen Kombinationstherapie erhalten die Patienten zusätzlich zu den 2 x 400 mg Vitamin E noch 3 x 500 mg Ascorbat pro Tag zu den Mahlzeiten. Die Untersuchungen erfolgen ebenfalls in einem 4-wöchigen Abstand.

#### 4. Phase: Kontrolle

In der insgesamt 12 Wochen dauernden Kontrollphase kommen die Probanden in einem 6-wöchigen Abstand zu den Untersuchungen. Während dieser Zeit werden keine Vitamine eingenommen.

#### 5. Phase: Vitamin-E-Kontrollgabe

Die ersten 4 in die Studie eingeschlossenen Patienten des Kollektivs nehmen für weitere 3 Monate erneut 2 x 400 mg Vitamin E pro Tag ein und werden alle 4 Wochen zu den Untersuchungen geladen.

### 3.3. Untersuchte Proben

Zur Bestimmung der Parameter wurde venöses Blut verwendet, welches in zwei EDTA-Röhrchen (5 ml + 10 ml), in einem Heparin-Röhrchen (10 ml) und in einem Serum-Röhrchen (10 ml) abgenommen wurde. Anschließend wurden die Röhrchen gekühlt, zentrifugiert (5 min, 3.000 U/min) und das Plasma bzw. Serum in Eppendorfhütchen portioniert. Für die Bestimmung der Blutfette, des HbA<sub>1c</sub> und des Fruktosamins wurden die Proben sofort den Messverfahren zugeführt. Zur Bestimmung der Vitamine, des Hb-AGE und des Malondialdehydes wurden die portionierten Proben bei -70°C eingefroren.

Aus den Probenröhrchen wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

1. Heparin: Vitamin E + C, Hb-AGE, MDA
2. Serum: HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, Fruktosamin
3. EDTA: HbA<sub>1c</sub>

Für die Albuminbestimmung wurde ein Aliquot des 24-h-Urins abgefüllt.

### **3.4. Albumin**

Die Albuminbestimmung im Urin wurde mit Hilfe des Mikro-Albumin-Tests der Firma Beckman bestimmt. Der Mikro-Albumin-Reagenzien-Kit bestimmt mittels kinetischer Nephelometrie quantitativ Mikroquantitäten von Humanalbumin.

Dabei wird die, von den in der Lösung schwebenden Teilchen verursachte, Zunahme der Lichtstreuung gemessen. Die Teilchen werden durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion gebildet. Das Humanalbumin ist das Antigen, das an einen Humanalbuminantikörper gebunden wird.

Die Reaktion verursacht eine Streulichtzunahme, die in ein Signal der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit umgewandelt wird und der Probenkonzentration an Albumin proportional ist.

Aus diesem Signal werden während der Kalibration vom Analysator spezifisch für jedes Assay automatisch die Konzentrationseinheiten errechnet.

#### **3.4.1. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte**

- Beckman-Nephelometer
- Zentrifuge (mind. 3.000 x g)
- Kalibrator 4
- Kalibrator 3

#### **3.4.2. Reagenzien**

- MA-Antikörper (5 ml): Humanalbumin, Humanalbumin-Säugetier-Antikörper mit 0,1% (w/v) Natriumazid, Lagerung bei 2 - 8°C



### 3.4.3. Vorbereitung

Reagenzien, Kalibrator und Proben werden vor Beginn der Bestimmung auf Zimmertemperatur gebracht.

### 3.4.4. Durchführung der Albuminbestimmung

1. Die maximal 72 h bei 2 - 8°C gelagerten Urinproben werden 10 min bei 3.000 g zentrifugiert, um Schmutz und Fremdzellen zu entfernen.
2. Eine unverdünnte Lösung des Kalibrators 4, des Kontrollurins 4 und der Urinproben wird zur Albuminbestimmung benutzt.
3. Für eine Antigenüberschussbestimmung wird eine 1:1296-Verdünnung des Kalibrators 3 verwendet.
4. Proben mit einem erhöhten Albumingehalt werden nochmals verdünnt.
5. Das Beckman-ICS wird programmiert, indem die Kalibrator-4- und die Antikörperkarte eingelesen werden.
6. Erscheint auf dem Display die Anzeige „INSERT CELL. STIR.“, werden 600 µl Puffer mit Rührer in das Gerät gestellt. Anschließend ist darauf zu achten, dass der Deckel geschlossen ist.
7. Erscheint auf dem Display die Anzeige „INJ. CAL DIL A.“, werden 42 µl der unverdünnten Kalibrator-A-Lösung durch die Deckelöffnung einpipettiert.
8. Bei der Displayanzeige „INJ. ANTI. MA“ werden 42 µl der Human-albuminantikörperlösung innerhalb von 20 Sekunden einpipettiert.
9. Sollen die Konzentrationseinheiten während der Messung verändert werden, ist die Taste „OPTION“ zu drücken.
10. Die Schritte 6. - 9. werden wiederholt. Um eine Kalibration erfolgreich durchzuführen, müssen mindestens 2 von 3 aufeinander folgenden maximalen Reaktionsgeschwindigkeitsmessungen innerhalb eines vorprogrammierten Prozentsatzes liegen.

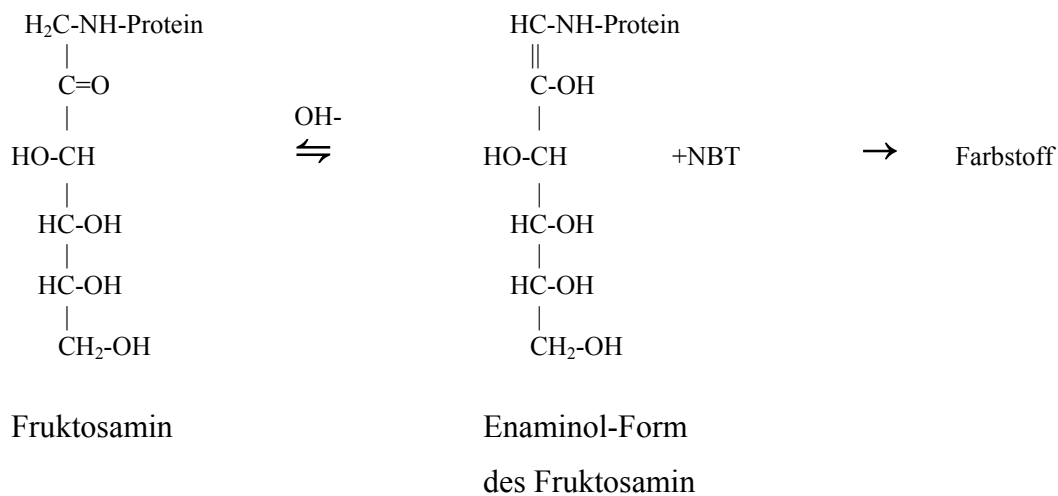
11. Nach erfolgreicher Kalibration erscheint auf dem Display: „MA C = (Zielkonzentration)“.
12. Für die erste Probenbestimmung wird Schritt Nr. 6 wiederholt. Anschließend wird auf dem Display „INJ. SAMP DIL.A“ angezeigt. Daraufhin werden 42 µl der ersten Urinprobe durch die Deckelöffnung einpipettiert.
13. Es erscheint erneut „INJ. ANTI. MA“ auf dem Display, worauf innerhalb von 20 Sekunden 42 µl der Antikörperlösung einpipettiert werden.
14. Nachdem der Peakwert bestätigt wurde, rechnet das ICS die gemessenen Signale in Konzentrationswerte um. Sollte der Messwert außerhalb eines normalen Messbereiches liegen, so ist die Probe erneut nach Angabe des Gerätes unter geeigneter Verdünnung zu bestimmen.

### 3.5. Fruktosamin

Die Fruktosaminbestimmung wurde mit der Testkombination der Firma Boehringer-Ingelheim durchgeführt.

Die Bestimmung des Fruktosaminspiegels wird durch die im alkalischen Milieu mögliche Reduktion von Nitrotetrazolium-Blau durch Ketoamine, in diesem Fall Fruktosamin, durchgeführt. Die Konzentration des entstehenden Formazans ist der Fruktosaminkonzentration direkt proportional. Diese kann damit gegen den Standard des glykierten Humanserumalbumins photometrisch quantifiziert werden. Der Zusatz von nionischen Detergenzien und Urikase vermeidet eine Störung der Reaktion durch Serumlipide und Harnsäure.

Die Bestimmung erfolgt nach den folgenden Reaktionsschritten:



### 3.5.1. Reagenzien

a. Puffer:

- Test-Kombination Fruktosamin 2 x 100 ml der Firma Boehringer-Ingelheim

b. NBT/Urikase:

- Test-Kombination Fruktosamin 2 x 5 Tbl. der Firma Boehringer-Ingelheim

c. Standard:

- Precimat Fruktosamin 3 x 1 ml der Firma Boehringer-Ingelheim

d. Qualitätskontrolle:

- Precinorm Fruktosamin 3 x 1 ml der Firma Boehringer-Ingelheim
- Precipath Fruktosamin 3 x 1 ml der Firma Boehringer-Ingelheim

Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von 5 Tbl. der NBT/Urikase Reagenz in 100 ml des Puffers hergestellt. Der Puffer ist durch 200 mmol/l Natriumbicarbonatpuffer auf einen pH-Wert von 10,3 eingestellt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei Zimmertemperatur ist die Lösung gebrauchsfertig. Die Haltbarkeit der Lösung beträgt in einer braunen Lichtschutzflasche drei Tage bei Zimmertemperatur (15 - 25°C) und vierzehn Tage bei Kühlschranktemperatur (2 - 8°C).

### 3.5.2. Probenmaterial

Die Bestimmung des Fruktosamins erfolgt aus den venösen Serumproben der Probanden/innen. Die Proben können im Kühlschrank (2 - 8°C) zwei Wochen gelagert werden. Die Lagerung bei -20°C erhöht die Lagerzeit auf zwei Monate. Dabei ist Zweimaliges einfrieren möglich.

Es gibt Hinweise in der Literatur, die selbst nach 12-monatiger Lagerung keine Abweichungen des Ergebnisses gefunden haben.

### 3.5.3. Durchführung der Bestimmung

Zur Durchführung der Bestimmung werden die entsprechenden Küvetten nach folgendem Schema befüllt:

	Leerwert	Standard	Probe
Destilliertes Wasser	0,05 ml	-	-
Reaktionslösung	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Precimat Fruktosamin	-	0,05 ml	-
Serum	-	-	0,05 ml

Die entsprechenden Ansätze werden in den Küvetten für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt sofort die erste photometrische Messung mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm. Dieser Wert entspricht E1. Nach weiteren 5 min erfolgt die zweite Messung (E2).

Zur Berechnung der Fruktosaminkonzentration wird im ersten Schritt die jeweilige Differenz der Messwerte E2 und E1 aller Ansätze (Leerwert, Standard und Proben) bestimmt.

Anschließend kann für jede Probe die Fruktosaminkonzentration nach der folgenden Formel bestimmt werden:

$$c = [\text{Precimat Fruktosamin}] \times (E \text{ Probe} - E \text{ Leerwert}) / (E \text{ Standard} - E \text{ Leerwert})$$

### 3.6. HbA<sub>1c</sub>

Die Bestimmung des HbA<sub>1c</sub> wurde mit dem Diamat-Analysensystem der Firma BIO-RAD-Laboratories GmbH durchgeführt. Dabei lassen sich die folgenden Fraktionen voneinander trennen und ausdrucken:

- |                      |                      |                      |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1. HbA <sub>1a</sub> | 2. HbA <sub>1b</sub> | 3. HbA <sub>1c</sub> |
| 4. HbA <sub>1</sub>  | 5. HbA <sub>0</sub>  | 6. HbF               |

Die Fraktion 4 wird als Summe der Fraktionen 1 - 3 ausgegeben. Das Prinzip der HPLC-Bestimmung beruht auf der Trennung der einzelnen Hämoglobinfractionen durch ein sphärisches Kationenaustauschergel. Das automatisch auf 8°C gekühlte Hämolysat wird mit hohem Druck durch die gefüllte Trennsäule gepresst. Es werden drei Phosphatpuffer mit steigender Ionenstärke verwendet, um die verschiedenen Fraktionen aus der Säule zu eluieren. Die einzeln eluierten Fraktionen werden durch Zweiwellenmessung (bei 415 und 690 nm) erkannt.

#### 3.6.1. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

1. Autodiluter: zur Herstellung des Hämolysates
2. 2 Kontrollen: zur Überprüfung der Richtigkeit der Messergebnisse
3. Inkubator: zum Inkubieren der hämolysierten Proben und Kontrollen

#### 3.6.2. Reagenzien

1. Hämolysereagenz: 1 Flasche zu 1 l einer 0,1%igen (v/v) Polyoxiethylenether-Lösung in Boratpuffer mit Stabilisator Natriumazid
2. Elutionspuffer 1: 2 Flaschen mit jeweils 2,4 l Phosphatpuffer mit Stabilisator Natriumazid
3. Elutionspuffer 2: 1 Flasche mit 2,4 l Phosphatpuffer mit Stabilisator Natriumazid

4. Elutionspuffer 3: 2 Flaschen mit jeweils 2,1 l Phosphatpuffer mit Stabilisator Natriumazid
5. Waschlösung : 1 Flasche mit 2,1 l Phosphatpuffer mit Stabilisator Natriumazid
6. Analytische Trennsäule: HPLC-Säule, gefüllt mit sphärischem Kationenaustauschergel der Maße ID 4 mm \* 150 mm
7. 4 Vorfilter: jeweils für 250 Untersuchungen
8. HbA<sub>1c</sub>-Referenzstandard: 10 Fläschchen mit lyophilisiertem Vollbluthämolysat mit Konservierungsmittel, plus 1 Flasche mit 120 ml Verdünnungsreagenz aus KCN- und Boratlösung
9. Probengefäße: 1.000 Polypropylenröhrchen zu jeweils 1,5 ml

Die Lagertemperatur beträgt für den Referenzstandard +2 - 8°C. Für die anderen Reagenzien genügt die Lagerung bei Raumtemperatur.

### **3.6.3. Vorbereitung**

#### **3.6.3.1. Herstellen des HbA<sub>1c</sub>-Referenzstandards**

Der lyophilisierte Standard wird durch Zugabe von 10 ml kaltem Verdünnungsreagenz rekonstituiert. Nach 5 - 10 Minuten Ruhe wird der Standard vorsichtig geschwenkt, bis sich das gesamte Lyophilisat gelöst hat. Der gelöste Standard ist bei einer Temperatur von +2 - 8°C nur 7 Tage stabil. Es empfiehlt sich, ihn in kleineren Portionen bei einer Temperatur von -20°C zu lagern. Die Stabilität des Standards erhöht sich dadurch auf 90 Tage. Der aufgetaute Standard darf nicht wieder eingefroren werden.

#### **3.6.3.2. Herstellen der Kontrollen**

Bei der Herstellung der Kontrollen gelten die gleichen Bedingungen wie für die Herstellung des Referenzstandards, bei gleicher Haltbarkeit.

### 3.6.4. Durchführung des Tests

Vor Beginn des Tests wird das Diamat-Analysensystem eingeschaltet, da das Gerät etwa 30 min zur Equilibrierung und zum Aufwärmen benötigt. Auch der Inkubator sollte vor Beginn des Tests eingeschaltet werden, um genügend Zeit zum Aufwärmen zu haben. Alle Proben und Reagenzien werden vor Testbeginn auf Zimmertemperatur gebracht. In dieser Zeit können die Proben und Kontrollen schon gemischt werden.

Ist das Diamat-Analysensystem aufgewärmt, werden zuerst zwei Proben des Referenzstandards untersucht. Dazu werden die Standards unbehandelt in Probengefäße gefüllt und in den automatischen Probengeber gestellt. Das Ergebnis des zweiten Standards sollte nicht mehr als 0,2% von dem angegebenen Sollwert abweichen. Ist der Unterschied größer, wird das System entsprechend der Bedienungsanleitung neu kalibriert.

Wenn das Ergebnis in Ordnung ist, werden die Proben und die Kontrollen vorbereitet. Dazu werden die gut gemischten Proben bzw. Kontrollen mit Hilfe des Autodiluters aufgezogen und anschließend in ein Probengefäß gegeben. Es ist darauf zu achten, dass bei der Reagenzienspritze – links - des Autodiluters der 50%-Stift und bei der Probenspritze – rechts - der 5%-Stift eingesetzt ist. Die hämolysierten Proben und Kontrollen werden dann 30 min in den auf +37°C erwärmten Inkubator gestellt. Nach Ablauf der Zeit werden die Probengefäße in den Probenraum des automatischen Probengebers gegeben, das Diamat-Analysensystem auf die erste und auf die letzte Probennummer programmiert und gestartet.

Nach der Beendigung der Analysenserie ertönt ein Pfeifton, an den sich ein 15-minütiger Waschzyklus des Systems anschließt. Die Analysenergebnisse jeder Probe werden automatisch einzeln ausgedruckt, wobei jede Untersuchung etwa 8 min dauert.



### **3.7. Hb-AGE**

Die Bestimmung der Hb-AGE-Konzentrationen wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Richard Bucala, Manhasset New York, USA durchgeführt. Dazu wurden die vorbereiteten Proben auf Trockeneis gelagert und per Kurier in die USA gesandt.

Das Prinzip der Bestimmung beruht auf einem ELISA-Test, bei dem durch eine Antigen (Hb-AGE) – Antikörperreaktion ein Komplex entsteht, an dem ein weiterer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, bindet. Anhand einer anschließend ablaufenden enzymatischen Farbreaktion kann die Konzentration des Hb-AGE bestimmt werden. Die Messung erfolgte in den USA nach folgender Anleitung.

#### **3.7.1. Isolierung der Erythrozyten aus frischem Vollblut**

Das Vollblut wird in Heparinröhrchen gesammelt. Die Abtrennung vom Plasma erfolgt durch eine zehnminütige Zentrifugation mit 2 - 3000 U/min. Das überstehende Plasma wird entfernt und die Erythrozyten mit isotoner Kochsalzlösung (0,85%) resuspendiert. Die Menge an Kochsalzlösung entspricht der Menge des Plasmas. Anschließend werden Kochsalzlösung und Erythrozyten wie zuvor beschrieben durch Zentrifugation voneinander getrennt.

Soll die Lagerungszeit der Erythrozyten vor der Hb-AGE-Bestimmung weniger als eine Woche betragen, werden die Erythrozyten zweimal mit NaCl-Lösung aufgenommen und jeweils für 30 min in der Lösung inkubiert. Die Lagerung erfolgt in der Kochsalzlösung im Kühlschrank.

Sollte die Lagerungszeit vor der Bestimmung länger als eine Woche sein, werden die Erythrozyten, bevor Sie bei -20°C als Pellet eingefroren werden, eine Nacht in isotoner NaCl-Lösung inkubiert.

### **3.7.2. Präparierung des Hämolysates von gefrorenen und gepackten Erythrozyten**

1 ml der gepackten Erythrozyten werden ohne weitere Behandlung in ein Röhrchen überführt. Dazu werden 3 ml destilliertem (dest.) Wasser und 3 ml Toluol gegeben. Die Suspension wird 6-mal auf dem Rüttler gemischt. Anschließend werden die so präparierten Erythrozyten 10 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Es entstehen zwei Phasen. Die obere Toluolphase wird mit Hilfe einer an eine Saugflasche angeschlossenen Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Nun wird mit Hilfe der Pasteurpipette die rote wäßrige Phase zwischen der Lipidschicht und dem Pellet am Boden des Röhrchens abgesaugt. Bei Bedarf kann dieses Hämolysat bei +4°C zwischengelagert werden.

### **3.7.3. Präparierung des Hämoglobins für den Assay**

50 µl des Hämolysates werden zu 3 ml destilliertem Wasser in ein Glaszentrifugenröhrchen gegeben. Es wird 1 ml einer eiskalten 24%igen TCA-Lösung dazugegeben und 15 min inkubiert.

Diese Lösung wird anschließend 30 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Danach wird der Überstand mit Hilfe einer an eine Saugflasche angeschlossenen Pasteurpipette entfernt und verworfen. Vorsichtig wird sämtliche TCA-Lösung mit der Pipette vom Pellet und der Röhrcheninnenwand entfernt. Die Pellets werden 10 min bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen. Sämtliche eventuell übriggebliebene TCA-Lösung wird entfernt.

Ein Pellet wird in 75 µl einer 1 N NaOH-Lösung gelöst und solange auf dem Rüttler gemischt, bis sich das komplette Pellet gelöst hat. Falls sich das Pellet nicht löst oder Ausflockungen enthält, kann es nicht für den Test verwendet werden.

Nun gibt man 500 µl eines 0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Puffers (pH: 7,4) hinzu und mischt gut.

Diese Lösung ist die „Teststammlösung“. Die Stammlösung sollte keine Ausfällung zeigen und kann bei +4°C über Nacht gelagert werden.

Eine 1:3-Verdünnung mit 0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Puffer (pH 7,4) der „Teststammlösung“ muss direkt vor Beginn des Tests angesetzt werden. Diese Lösung ist die „Testarbeitslösung“ und sowohl die Hb-AGE-Bestimmung als auch die Gesamtproteinbestimmung (Lowry) werden mit ihr durchgeführt. Eine auftretende Ausfällung muss direkt vor der Benutzung dieser Lösung auf dem Rüttler in Lösung gebracht werden, um akkurate Ergebnisse bei der Bestimmung des Gesamtproteins und des Hb-AGE zu erhalten.

### **3.7.4. Präparierung der AGE-BSA-Platten**

#### **3.7.4.1. Coatingpuffer (0,1 M $\text{NaHCO}_3$ pH 9,6, 0,02% $\text{NaN}_3$ )**

1. 8,3 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,2 g  $\text{NaN}_3$  und 900 ml deionisiertes Wasser werden gemischt und auf pH 9,6 eingestellt. Anschließend wird mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.
2. Die Antigen-Stammlösung (AGE-BSA) wird durch Verdünnung der „Masterlösung“ in Coatingpuffer hergestellt, so dass die Konzentration 1 mg/ml ergibt. Die Arbeitslösung wird durch Verdünnung der Stammlösung mit Coatingpuffer auf eine Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  erzielt.
3. 100  $\mu\text{l}$  der Antigenlösung werden in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte überführt. Die Platte wird bei +4°C für 2 - 12h inkubiert, nachdem Sie mit Sealingtape abgedeckt wurde.
4. Die Mikrotiterplatte wird 3-mal in zwei verschiedene Richtungen im Platemasher mit 0,2 ml Waschpuffer je Well gewaschen.
5. Die Mikrotiterplatte wird mit 0,15 ml Blockingpuffer je Well 1 h lang inkubiert.
6. Die Platte wird 3-mal wie in Punkt 3 beschrieben gewaschen.

### 3.7.4.2. AGE-Assay-Anleitung

1. In jedes Well werden 50 µl der Proben gefolgt von 50 µl der 1°-Antikörperlösung (entsprechender Titer in Verdünnungspuffer gelöst). Die 1°-Antikörperlösung sollte mit einer Multikanalpipette hinzugegeben und anschließend die Mikrotiterplatte geschüttelt werden, damit sich die Lösungen mischen.
2. Inkubation der Mikrotiterplatten für 2 h bei Raumtemperatur
3. Die Platten werden in zwei Richtungen 3-mal mit Waschpuffer auf einem Plattenwascher gespült. Das verwendete Volumen beträgt 200 µl.
4. Es werden 100 µl 2°-Antikörperlösung zu den entsprechenden Wells hinzugegeben.
5. Die Platten werden bei 37°C für 1 h inkubiert.
6. Die Platten werden wie unter Punkt 3 beschrieben gewaschen.
7. Es werden 100 µl PNPP (Substrat) zu den entsprechenden Wells gegeben.
8. Die Absorption wird mit Hilfe eines Plattenlesers bestimmt (Dynatech MR). Folgende Parameter werden eingestellt:

Testwellenlänge:	410 nm	Threshold:	0,00
Referenzwellenlänge:	570 nm	Kalibrierung:	1,00

Notiz: Der primäre und sekundäre Antikörper (Konjugat) werden mit Verdünnungspuffer angesetzt. Die B0-Wells werden mit 50 µl einer 0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung mit pH 7,4 anstelle der Probe gefüllt. (Siehe Abbildung Mikrotiterplattenbefüllung).

### 3.7.4.3. Mikrotiterplattenbefüllung

**MICROTITER PLATE SET-UP**

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12
A	BLANK	2°Ab (Background)	1° + 2° Ab (B <sub>0</sub> )	15 µg (STD)
B	7.5 µg (STD)	3.75 µg (STD)	1.88 µg (STD)	0.94 µg (STD)
C	0.47 µg (STD)	0.23 µg (STD)	Control Level 1	Control Level 2
D	Control Level 3	Sample	Sample, etc.	
E				
F				
G				
H				

BLANK: 50 µl dilution buffer + 50 µl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/100 µl dilution buffer/substrate

2°Ab: 50 µl dilution buffer + 50 µl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/100 µl 2°Ab/substrate

1° + 2°Ab: 50 µl Primary Ab + 50 µl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/100 µl 2°Ab/substrate

### 3.7.5. Die Lösungen

#### 3.7.5.1. Coatingpuffer

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,6; 0,002% NaN<sub>3</sub>

Es werden

- 8,3 g NaHCO<sub>3</sub> und

- 0,2 g NaN<sub>3</sub> mit

- 900 ml deionisiertem Wasser auf pH 9,6 eingestellt.
- Anschließend wird auf 1.000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

### **3.7.5.2. Blocking-Puffer**

CMF-PBS mit 2% Ziegenserum; 0,2% bovines Serumalbumin (BSA); 0,02%  $\text{NaN}_3$

Es werden folgende Bestandteile miteinander gemischt:

- 0,10 g BSA
- 1 ml Ziegenserum
- 0,01 g  $\text{NaN}_3$
- 50 ml CMF-PBS

### **3.7.5.3. Verdünnungspuffer**

Der Verdünnungspuffer wird wie unter Punkt 3.7.6.2. beschrieben angesetzt.

### **3.7.5.4. Substratpuffer (entweder Puffer A mit Substrat A oder Puffer B mit Substrat B)**

A. 1 M Diethanolamin (DEA)-Puffer

- Zu 105,1 g DEA (flüssig) werden
- 800 ml deionisiertes Wasser hinzugeben.
- Anschließend werden 0,2 g  $\text{NaN}_3$  und 0,1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in die Lösung gegeben und
- auf pH 9,8 eingestellt.
- Zum Schluss wird die Lösung auf 1.000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

B. 0,1 M DEA-Puffer

- wie Puffer A nur mit 10,5 g Diethanolamin statt 0,1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

### **3.7.5.5. PNPP-Substrat**

- A. Eine 15 mg Tablette PNPP (Sigma #N9389) wird in 15 ml 1 M DEA-Substratpuffer A gelöst.
- B. Es werden 15 mg Pulver PNPP (Sigma # N2507) in 15 ml 0,1 M DEA-Substratpuffer B gelöst.

### **3.7.5.6. 1°Antikörper (Kaninchen Anti-AGE-Rnase)**

Jede Charge muss vor Gebrauch getitert werden.

Der Picower Antikörper ist 1:1000 – 1:5000 verdünnt.

Der Antikörper wird von der Arbeitsgruppe Bucala hergestellt (Makita et al., Science. 1992; 258 (5082): 651-3)

Die Verdünnung wird mit Verdünnungspuffer hergestellt.

### **3.7.5.7. 2° Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen IgG, Cappel # 59298)**

Jede Charge muss getitert werden (1:3000 - 1:5000).

Die Verdünnung wird mit Verdünnungspuffer hergestellt.

### **3.7.5.8. Waschpuffer**

Für den Waschpuffer werden

CMF-PBS mit 0,05% Tween-20 angesetzt.

Es werden 0,02% Natriumazid hinzugegeben, wenn die Lösung nicht bei jedem Test frisch angesetzt wird.

### **3.7.5.9. 0,3 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 4,0**

mit 5 N NaOH auf pH 7,4 einstellen

### **3.7.5.10. CMF-PBS-Puffer, pH 7,4**

Für diesen Puffer werden

8 g NaCl und

0,2 g KCl mit

1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und

0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in

800 ml dest. Wasser gelöst.

Mit HCl wird die Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Anschließend ist der Puffer mit dest. Wasser auf 1.000 ml aufzufüllen und im Autoklaven für 20 min bei 15 Pfund Druck zu autoklavieren.

## **3.7.6. Gesamtprotein (Lowry-Methode)**

### **3.7.6.1. Durchführung**

1. Es werden 10  $\mu\text{l}$  eines präparierten Hämoglobinassays mit Hilfe einer Eppendorfpipette (5 - 10  $\mu\text{l}$ ) zu einem Glasröhrchen (12 x 75 mm) gegeben. Ebenso werden die Standards wie unten beschrieben hinzugegeben.
2. 1 ml Lowry-Reagenz wird hinzugefügt, die Lösung gemischt und für 15 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert
3. 100  $\mu\text{l}$  des Folin & Ciocalteu's-Phenolreagenzes werden hinzugegeben und sofort auf dem Rüttler in zwei kurzen Intervallen gemischt. Es ist darauf zu achten, dass nicht zu aggressiv gemischt wird, um verfälschte Ergebnisse zu verhindern.



4. Das Röhrchen wird bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.
5. Die Proben werden in einem Zweistrahlphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm ausgelesen. Als Leerwert dient das Folin-Lowry-Reagenzgemisch (100 µl auf 1 ml).

### 3.7.6.2. Standards

1. Eine 1 mg/ml Masterstandardlösung von BSA (Sigma RIA Grade A7888 oder A7030) wird aus einer 300 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung mit 3 mmol Natriumazid hergestellt.
2. Die Standardlösungen für das Lowry-Reagenz wird wie folgt präpariert:  
Mit einer Eppendorfpipette (0,5 – 10 µl) werden 3,12 µl und 6,25 µl der Masterstandardlösung in ein Röhrchen gegeben und nach der oben beschriebenen Vorschrift behandelt. Mit einer Eppendorfpipette (10 – 100 µl) werden 12 und 25 µl der Masterstandardlösung in ein Teströhrchen gegeben und nach der oben beschriebenen Vorschrift behandelt. Es können noch weitere Mikro-Lowrystandards benutzt werden.

Notiz: Es können auch kommerziell erhältliche Testsätze entsprechend deren Vorschrift benutzt werden. Bei der Angabe der Ergebnisse soll der verwendete Test erwähnt werden.

### 3.7.6.3. Lösungen

#### 3.7.6.3.1. Lowry-Reagenz (pH 12,8)

Es werden

- a. 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1N NaOH gelöst. Zu dieser Lösung werden
- b. 2% Kalium-Natrium-Tartrat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sowie
- c. 1%  $\text{CuSO}_4$  gegeben.

Zu 50 ml von a. werden 0,5 ml von b. und 0,5 ml von c. gegeben.

Diese Lösung ist das Lowry-Reagenz, welches bei Raumtemperatur stabil ist und nicht im Kühlschrank aufbewahrt werden sollte. Bei jedem Testansatz ist dieses Reagenz frisch anzusetzen.

#### **3.7.6.3.2. Folin & Ciocalteu's-Phenolreagenz**

Die Arbeitslösung wird in einer Glasamber Flasche angesetzt. Darin werden eine Lösung von Sigma (F9252) und dest. Wasser im Verhältnis 1:1 gemischt. Das ergibt eine 1N Arbeitslösung, die bei Raumtemperatur gelagert werden sollte.

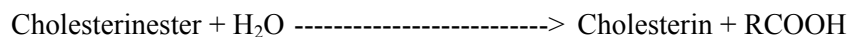
### 3.8. Cholesterin

Zur Bestimmung des Cholesterins wird der Cholesterintest der Firma Boehringer-Mannheim verwendet.

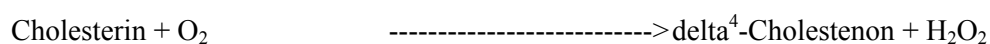
Zuerst wird das Reagenz nach Anleitung mit dest. Wasser aufgefüllt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min ist das Reagenz gebrauchsfertig. Anschließend werden in saubere Küvetten für jede Probe 20 µl EDTA-Plasma gefüllt. Dazu werden 2 ml des Reagenzes gegeben und die Küvetten mindestens 10 min bei +20 - 25°C inkubiert. Nun wird die Konzentration photometrisch gegen 2 ml des Reagenzes als Leerwert bestimmt. Das Ergebnis der Konzentration wurde sofort in mg/dl angezeigt, da bei dem in dieser Arbeit verwendeten Photometer der Firma Boehringer-Mannheim GmbH der Faktor für die Berechnung der Cholesterinkonzentration eingestellt werden konnte. Andernfalls wird die Extinktion der Probe, gemessen bei 546 nm, mit einem Faktor von 853 multipliziert.

Das Prinzip der Cholesterinbestimmung beruht auf einer enzymatischen Reaktion, die nach folgenden Reaktionsschritten verläuft:

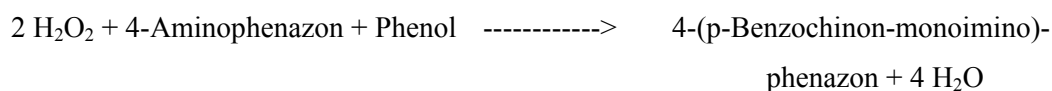
1. Cholesterinesterase



2. Cholesterinoxidase



3. Peroxidase



Diese Substanz ist der Cholesterinkonzentration proportional und lässt sich photometrisch nachweisen. Ab Cholesterinkonzentrationen von 1.000 mg/dl sollte der Ansatz verdünnt wiederholt werden.

### **3.9. HDL-Cholesterin**

Zur Bestimmung des HDL-Cholesterins müssen die übrigen Lipidfraktionen (LDL, VLDL) aus dem Serum ausgefällt werden. Zur Fällung wird der Präzipitationstest mit Quantilop der Firma Immuno AG verwendet. Das Cholesterin wird mit dem Cholesterintest der Firma Boehringer-Mannheim bestimmt.

Das in einem Röhrchen entnommene venöse Blut wird 10 min bei 3.000 U/min und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

Aus dem Serumröhrchen werden 100 µl Probenserum zu 200 µl Fällungsreagenz A des Tests in ein Eppendorfhütchen gegeben. Die gut gemischten Proben werden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden sie 3 Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert. Im Überstand der Eppendorfhütchen bleibt Serum mit der HDL-Fraktion zurück. Zur Bestimmung des Gehaltes an HDL-Cholesterin wird nun erneut der Cholesterintest wie unter Punkt 3.8. beschrieben durchgeführt.

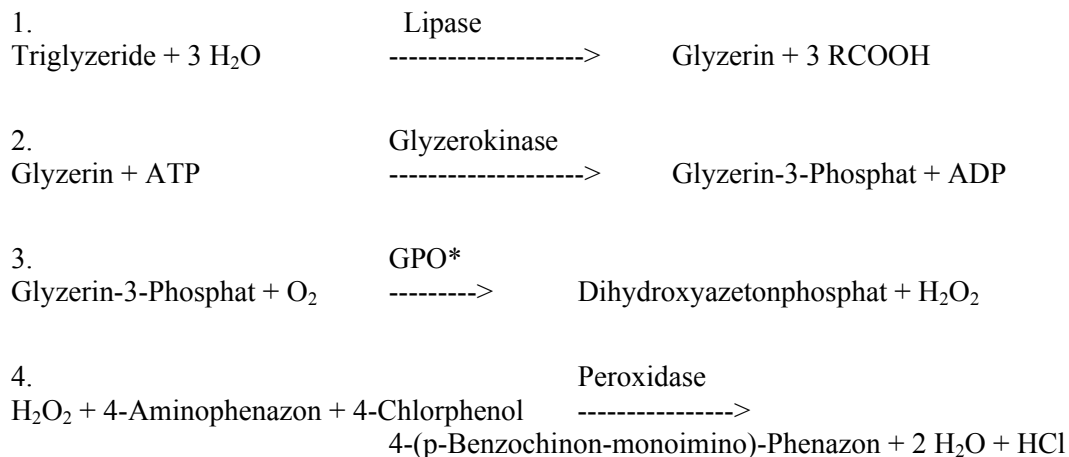
### 3.10. Triglyzeride

Zur Bestimmung der Triglyzeride wird der Triglyzeridtest der Firma Boehringer-Mannheim verwendet.

Ein Reagenzträger wird in eine Flasche mit Pufferlösung eingetaucht, der Flascheninhalt damit gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals gemischt. Anschließend ist der Reagenzträger zu werfen.

Von den Proben werden jeweils 20 µl EDTA-Plasma in eine Vollküvette gegeben und mit 2 ml Reagenz aufgefüllt. Die Küvetten werden für 10 min bei einer Temperatur von +20 - 25°C inkubiert. Innerhalb von 60 min wird die Extinktion gegen eine mit 2 ml Reagenz gefüllte Küvette als Leerwert bei 546 nm photometrisch bestimmt. Um die Triglyzeridkonzentration in mg/dl zu erhalten, ist die gemessene Extinktion mit dem Faktor 1.040 zu multiplizieren. Da bei dem in dieser Arbeit verwendeten Photometer von der Firma Boehringer Mannheim der Faktor eingestellt werden konnte, wurde die Triglyzeridkonzentration in mg/dl angezeigt.

Das Prinzip der Messung beruht auf einer enzymatischen Bestimmung der Triglyzeridkonzentration nach folgenden Gleichungen:



\*GPO = Glyzerinphosphatoxidase

Dabei ist die Konzentration der Triglyzeride der Konzentration an 4-(p-Benzochinon-monoimino)-Phenazon, die photometrisch bestimmt werden kann, proportional.

### 3.11. Vitamin E

#### 3.11.1. Lagerung der Proben

Zur Bestimmung des Vitamin-E-Gehaltes wurden Plasmaproben bei -70°C gelagert. Bei -20°C sind die Proben mindestens 6 Monate stabil.

#### 3.11.2. Durchführung

Die eingefrorenen Proben werden auf Zimmertemperatur gebracht und vor Gebrauch gut gemischt. In ein braunes Glasröhrchen mit Schliff werden nacheinander 300 µl Plasma, 300 µl dest. Wasser und 600 µl Ethanol (HPLC) gegeben und auf einem Rüttler mindestens für 10 Sekunden gemischt. Anschließend werden 1,2 ml Hexan (HPLC) in jedes Röhrchen gegeben und erneut etwa 60 Sekunden auf dem Rüttler gemischt. Um eine vollständige Phasentrennung zu erhalten, werden die Röhrchen bei 3.000 U/min gekühlt (ca.+10°C) zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein sauberes Glasröhrchen überführt. Aus diesem Röhrchen wird die Probe mit einer Hamiltonpipette auf die HPLC-Probenschleife (50 µl) überführt und der Gehalt gemessen.

#### 3.11.3. Material und Geräte

Ethanol (HPLC-Qualität)
Hexan (HPLC-Qualität)
dest. Wasser (HPLC-Qualität)
Braune Glasröhrchen mit Deckel
Hamiltonpipette (200 µl)

Vortexmischer
HPLC-Anlage
Säule
Probenschleife (50 µl)
Photometrischer Detektor

### **3.12. Vitamin C**

#### **3.12.1. Lagerung der Proben**

Zur Bestimmung des Vitamin-C-Gehaltes wurden die Proben bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die aufbereiteten Plasmaproben sind bei  $-80^{\circ}\text{C}$  12 Monate stabil.

##### **3.12.1.1. Probenaufbereitung**

Die Heparinröhrchen mit venösem Blut werden 10 min im Kühlschrank auf etwa  $+5^{\circ}\text{C}$  gekühlt und in einer gekühlten Zentrifuge für 10 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. In dieser Zeit werden Mikrolitergefäße (1,5 ml) mit 300  $\mu\text{l}$  einer 5%igen TCA-Lösung gefüllt. Anschließend werden von den zentrifugierten Proben 200  $\mu\text{l}$  in die Mikrolitergefäße gegeben, die Gefäße geschlossen und auf dem Rüttler gründlich gemischt. Die Mikrolitergefäße werden dann in einer Mikrozentrifuge für 5 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wird der Vitamin-C-Gehalt analysiert.

##### **3.12.2. Durchführung**

In saubere Glasröhrchen werden 50  $\mu\text{l}$  DNP-Reagenz und 150  $\mu\text{l}$  des Überstandes gegeben, kurz gemischt und in einem Wasserbad bei  $+60^{\circ}\text{C}$  für 1 h inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen sofort in ein Eisbad gestellt und 5 min abgekühlt. Zu den Lösungen werden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Mess-Schwefelsäure gegeben, kurz gemischt und 20 min bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Proben werden in Einmalküvetten überführt und im Photometer die Extinktion bestimmt.

**3.12.3. Material und Geräte**

Zentrifuge
Rüttler
Mikrozentrifuge
Einmalküvetten
5%ige TCA-Lösung
DNP-Reagenz
Mess-Schwefelsäure
Wasserbad
Eisbad



### **3.13. Malondialdehyd**

#### **3.13.1. Natriumazetatpuffer (20g/l) mit einem pH von 3,50**

Es werden 7,24 g Natriumazetattri-hydrat in einem 500 ml Becherglas in etwa 100 ml bidest. Wasser gelöst. Dieser Vorgang kann unter Erhitzen auf einer Magnet-rührplatte (10 min) beschleunigt werden. Zu dieser Lösung werden 24 ml konzentrierte Essigsäure gegeben. Der pH-Wert wird unter Kontrolle eines zuvor kalibrierten pH-Meters mit Hilfe von verdünnter Essigsäure (1:10) auf einen pH-Wert von 3,50 eingestellt. Der eingestellte Puffer wird in einen 250 ml-Messkolben überführt und bis auf die Eichmarke mit bidest. Wasser aufgefüllt.

#### **3.13.2. Thiobarbitursäurelösung (2 g/l)**

Es werden 0,5 g Thiobarbitursäure (TBA) in einem 250 ml Messkolben mit dem unter 10.1 angesetzten Natriumazetattri-hydratpuffer gelöst. Damit sich die TBA schneller löst, wird ein beheizbarer Magnet-rührer eingesetzt. Nachdem der Messkolben bis zu dem Eichstrich aufgefüllt ist, kann er bei +4°C gelagert werden.

#### **3.13.3. 2,6-Di-tert-Butyl-4-Methylphenollösung (50 g/l)**

Es werden 2,5 g BHT in einem 50 ml-Messkolben mit 99%igem Ethanol gelöst. Der Messkolben wird bis zu der Eichmarke mit Ethanol aufgefüllt und bei +4°C gelagert.

### 3.13.4. MDA-Standardlösungen

Es wird eine MDA-Stammlösung (10 mmol) angesetzt. Malonaldehyd-bis-Methylazetal (TMP) ist lichtgeschützt bei +4°C aufzubewahren. Mit TMP wird eine 10 mmol Lösung angesetzt. Dazu wird 0,164 g TMP in einem 100 ml Messkolben abgewogen und mit 1%iger Schwefelsäure bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung muss anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren, um eine vollständige Hydrolyse des TMP zu erreichen. Die Haltbarkeit dieser TMP-Stammlösung beträgt eine Woche.

Für die Standardlösungen der Kalibrierkurve muss die Stammlösung zuerst mit 1%iger Schwefelsäure 1:100 verdünnt werden. Anschließend können die Standards wie folgt angesetzt werden:

- Standard I: Leerwert, ein 10 ml Messkolben wird mit 1%iger Schwefelsäure aufgefüllt
- Standard II: 0,25  $\mu\text{mol}$ , 25  $\mu\text{l}$  der 1:100 verdünnten Stammlösung werden in einem 10 ml Messkolben mit 1%iger Schwefelsäure bis zur Eichmarke aufgefüllt
- Standard III: 0,50  $\mu\text{mol}$ ; 50  $\mu\text{l}$  der 1:100 verdünnten Stammlösung werden in einem 10 ml Messkolben mit 1%iger Schwefelsäure bis zur Eichmarke aufgefüllt
- Standard IV: 0,75  $\mu\text{mol}$ , 75  $\mu\text{l}$  der 1:100 verdünnten Stammlösung werden in einem 10 ml Messkolben mit 1%iger Schwefelsäure bis zur Eichmarke aufgefüllt
- Standard V: 1,00  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{l}$  der 1:100 verdünnten Stammlösung werden in einem 10 ml Messkolben mit 1%iger Schwefelsäure bis zur Eichmarke aufgefüllt
- Standard VI: 1,50  $\mu\text{mol}$ , 150  $\mu\text{l}$  der 1:100 verdünnten Stammlösung werden in einem 10 ml Messkolben mit 1%iger Schwefelsäure bis zur Eichmarke aufgefüllt

### 3.13.5. Die Umsetzung mit TBA

Etwa 15 min vor dem Analysenbeginn werden die tiefgefrorenen Plasmaproben bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die folgenden Reagenzien in Borosilikatröhrchen mit teflonbeschichteten Schraubdeckeln pipettiert:

1. 100 µl MDA-Standard I-VI oder Plasma
2. 2 ml TBA-Lösung (s. 10.2.)
3. 100 µl BHT-Lösung (s. 10.3.)

Die Röhrchen werden mit dem Reagenzglasschüttler gut gemischt und anschließend für 45 min bei +95°C in einem Metallheizblock inkubiert. Danach sind die Röhrchen sofort unter fließend kaltem Wasser abzukühlen.

Der entstandene rosafarbene (TBA)<sub>2</sub>-MDA-Komplex wird mit 2 ml n-Butanol aufgenommen und anschließend für 10 min bei 1.950 g zentrifugiert.

Aus den Röhrchen werden 1,5 ml Überstand in saubere und trockene Röhrchen überführt. Diese werden erneut bei +95°C im Metallheizblock inkubiert. Um das Verdampfen des n-Butanols zu erleichtern und eine weitere Bildung von MDA zu verhindern, werden die Röhrchen mit Stickstoff (0,25 bar) begast. Es ist darauf zu achten, dass die zur Stickstoffbegasung verwendeten Pasteurpipetten nicht mit dem Flüssigkeitsspiegel in den Röhrchen in Berührung kommen.

In den Röhrchen bleibt nach etwa 20 - 30 min ein schwach rosafarbenes Pulver zurück, das mit 500 µl eines Azetonitril-Wasser-Gemisches (1:4) aufgenommen wird. Anschließend kommen die verschlossenen Röhrchen für 5 min in ein Ultraschallbad, um den Lösungsprozess zu beschleunigen.

Nachdem die Proben erneut für 10 min bei 1.950g zentrifugiert wurden, um Protein- und Lipidreste abzutrennen, sind sie für die sich anschließende HPLC-Bestimmung vorbereitet.

### **3.13.6. Die HPLC-Analyse**

Aus den Borosilikatröhrchen werden jeweils 250 µl des Überstandes mit Hilfe einer Hamiltonspritze in das Ventil der HPLC eingespritzt.

Nach jedem Probenauftrag wird die Hamiltonspritze mehrfach mit dem Eluenten gereinigt.

Die HPLC-Analyse erfolgt nach folgenden Bedingungen:

Probenschleife	200 µl
Eluent:	Azetonitril/Wasser (1:4), entgast
Säule:	RP 18, 125 x 4,6 mm mit 5 µm Korngröße
Vorsäule:	RP 18, 20 x 4,6 mm
Flußrate:	0,5 ml/min
Druck:	85 bar

Der TBA-Komplex wird mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors bestimmt. Die Excitationswellenlänge beträgt 532 nm und die Emissionswellenlänge 553 nm. Der Analyt wird nach einer Laufzeit von etwa 2,9 min gemessen.

Die quantitative Bestimmung des Eluenten wird mit einem Integrator der folgenden Konfiguration vorgenommen:

Width	5	Slope	200
Drift	0	Min. Area	10
T.DBL	0	Stop tm.	6
Attenuation	2	Speed	3
Method #	44	Format	0
Spl. Wt	100	Is. Wt.	1

Zur quantitativen Berechnung der Konzentrationen werden die gemessenen Peakflächen herangezogen. Mit Hilfe der Standards I-VI wird eine Eichgerade durch lineare Regressionsanalyse erstellt. Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt können Faktoren berechnet werden, mit deren Hilfe der Integrator so programmiert werden kann, dass er aus den gemessenen Peakflächen die Konzentration des MDA-Komplexes berechnet und ausdruckt.

Zur Berechnung der Eluentenkonzentration werden folgende Gleichungen verwendet:

$$\text{Faktor 1} \quad F1 = (C1 - C2) / (A1 - A2)$$

$$\text{Faktor 2} \quad F2 = C2 - (F1 \times A2)$$

C1 = Konzentration 1

A1 = Fläche unter der Kurve von C1

C2 = Konzentration 2

A2 = Fläche unter der Kurve von C2

### 3.14. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung Anwendung und Dokumentation im Hochschulrechenzentrum an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows in der Version 6.1 durchgeführt.

Alle Messwerte wurden auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde eine deskriptive Analyse durchgeführt. Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den mittleren Messwerten zu ermitteln, wurde ein T-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Aufgrund der hohen Standardabweichung wurden die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der gemessenen Parameter dieser Studie werden in zwei unterschiedlichen Darstellungen präsentiert. In der ersten Abbildung werden die durchschnittlichen Messwerte der Probanden zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt. Jede Versuchsphase besteht daher aus vier Messwerten, die Kontrolle aus zwei Werten, und der Basiswert besteht aus dem Mittelwert der ersten drei Untersuchungen zur Verifizierung der Nephropathie. Die zweite Abbildung zeigt den durchschnittlichen Messwert aus den vier Untersuchungen einer Studienphase bzw. zwei Untersuchungen in der Kontrollphase.

Die Probanden erhielten zuerst über einen Zeitraum von 4 Monaten Vitamin E und anschließend für weitere 4 Monate Vitamin E und C. Während der Supplementierung wurde alle 4 Wochen eine Untersuchung durchgeführt. Nach Absetzen der Vitamine wurde das Intervall auf 6 Wochen verlängert. Der genaue Aufbau der Studie inklusive der Vitaminsupplementierung ist in Kapitel 3.2. ausführlich beschrieben.

Die Messzeitpunkte wurden mit Abkürzungen versehen, um die Übersichtlichkeit der Abbildungen zu verbessern. Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung:

Basis  $\triangleq$  durchschnittlicher Wert der drei Voruntersuchungen

4.Wo Vit E  $\triangleq$  Messwert nach 4-wöchiger Vitamin-E-Supplementierung

4.Wo Vit E+C  $\triangleq$  Ergebnis der Untersuchung nach 4-wöchiger Vitamin-E+C-Gabe

16Wo Vit E  $\triangleq$  Durchschnittswert aus vier Untersuchungen nach 16-wöchiger Vitamin-E-Gabe

Kontrolle 1  $\triangleq$  Messwert nach 6-wöchiger Supplementierungspause

## 4.1. Die Messergebnisse der Gruppe A

### 4.1.1. Die Albuminausscheidung der Einzelmesszeitpunkte

Die durchschnittlichen Albuminausscheidungen während der Vitamin-E-Gabe zeigen gegenüber dem Basiswert einen deutlichen Rückgang, der nicht statistisch gesichert werden konnte.

Die Albuminausscheidung sinkt im Verlauf der Studie bis zur vierten Woche der Vitamin-E+C-Gabe. Bis zur zweiten Kontrolle steigt sie leicht an. Unter erneuter alleiniger Vitamin-E-Gabe sinkt die Albuminausscheidung wieder unter den Kontrollwert ab. Sämtliche Messwerte unterscheiden sich nicht signifikant vom Basiswert.

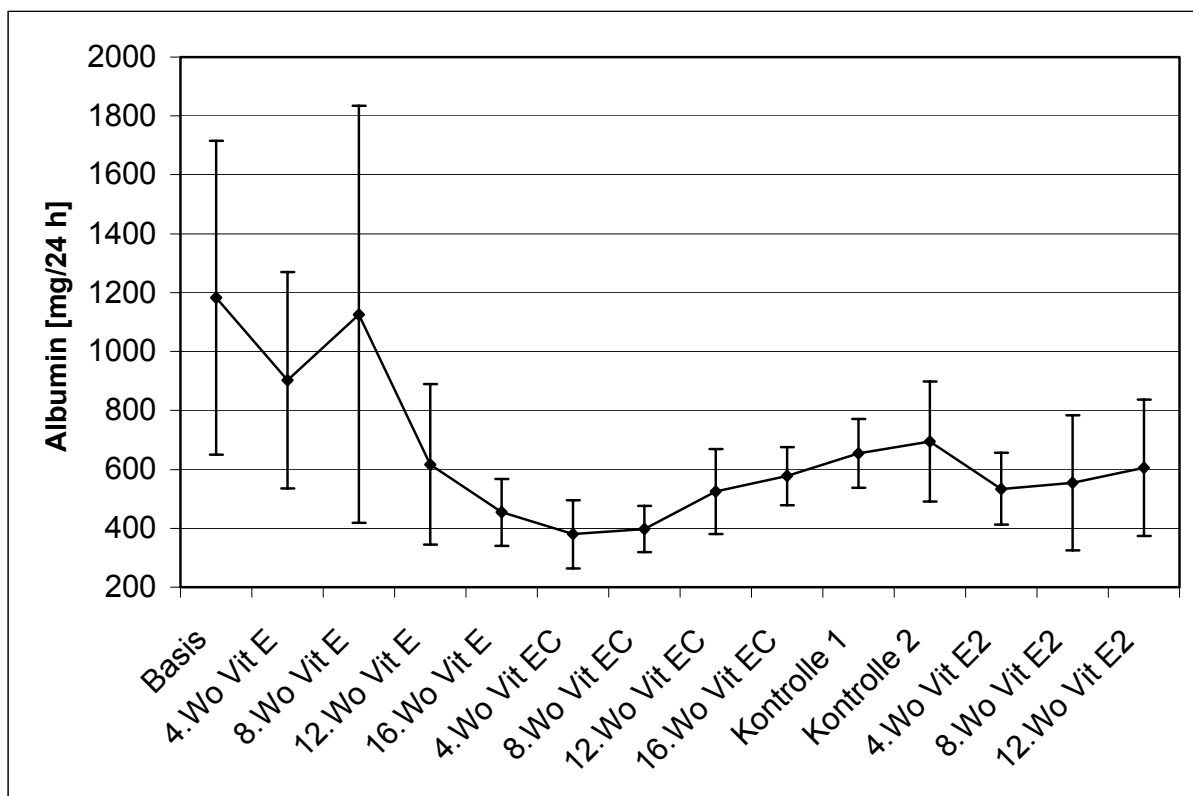


Abb. 18 zeigt die durchschnittliche Albuminmenge im Urin von Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Albuminausscheidung an.

#### 4.1.2. Die gemittelte Albuminausscheidung

Die durchschnittlichen Albuminausscheidungen während der gesamten Vitamin-supplementierung zeigen gegenüber dem Basiswert einen gleichbleibenden und insgesamt auffälligen Rückgang (von ca. 1200 mg/24 h beim Basiswert auf ca. 500 mg/24 h unter der Kombinationstherapie).

Der durchschnittliche Wert nach dem Absetzen der Vitamine steigt gegenüber denen der Supplementierung an. Die erneute Vitamin-E-Gabe führt zu einem Abfall der Albuminausscheidung unter den Wert der Kontrolle.

Sämtliche Messwerte können nicht statistisch gesichert werden.

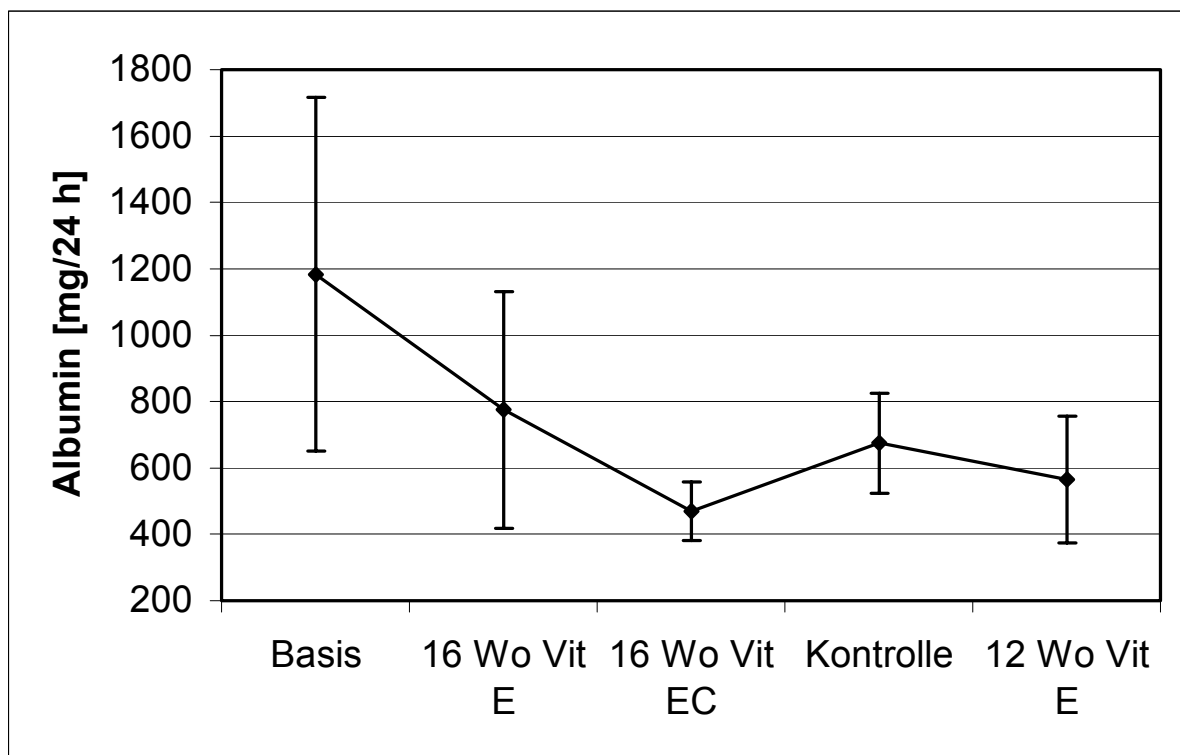


Abb. 19 zeigt die gemittelte Albuminmenge im Urin der Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Albuminausscheidung an.



#### 4.1.3. Die prozentuale Änderung der Albuminausscheidung

Die durchschnittliche Senkung der Albuminausscheidung nach 4 Monaten unter Vitamin-E-Supplementierung beträgt 34,5%.

Am Ende der 16-wöchigen Kombinationstherapie beträgt der gemittelte prozentuale Rückgang der Albuminausscheidung 60,3%. In der 12 Wochen dauernden Kontrollphase ohne Vitamingabe erhöht sich die Albuminausscheidung und liegt mit 42,9% unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei erneuter Supplementierung von Vitamin E sinkt die Albuminausscheidung unter den Kontrollwert. Sie liegt gemittelt aus zwei Werten mit 52,3% unterhalb des Basiswertes.

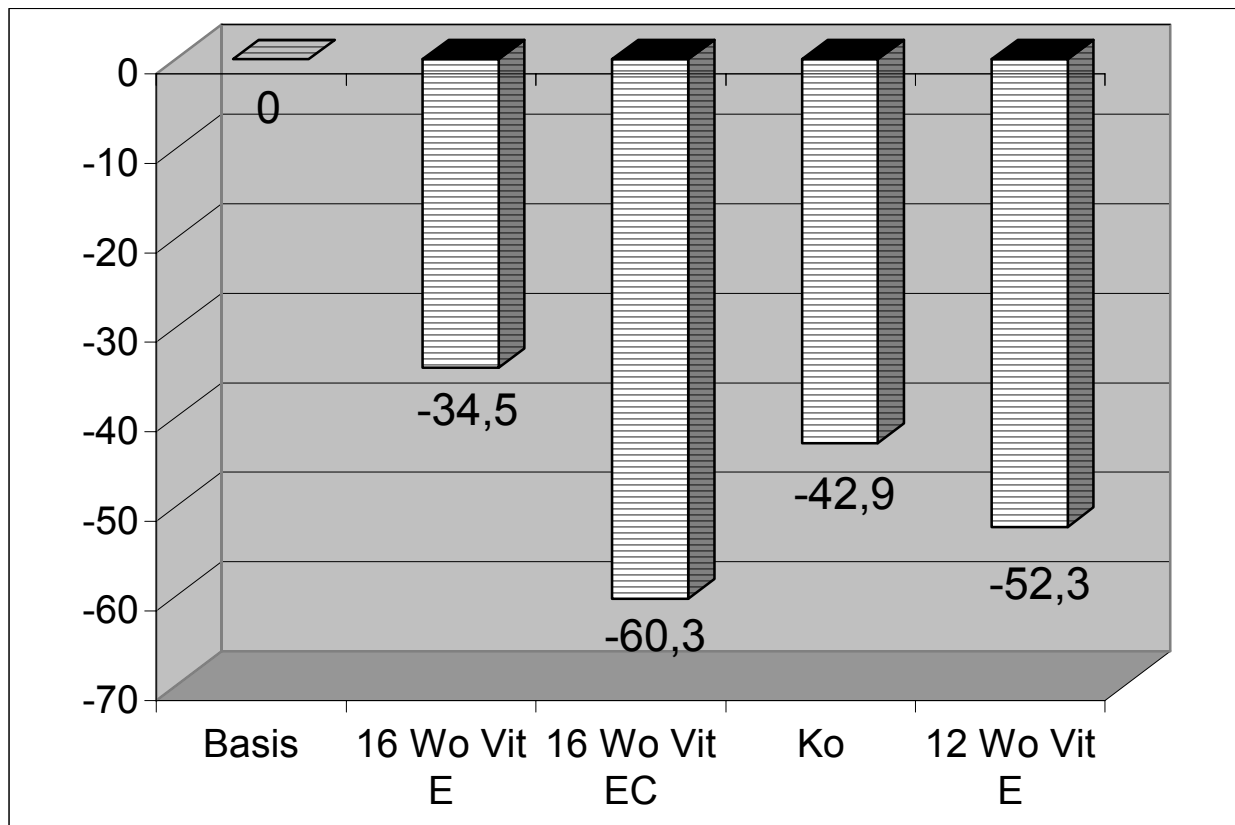


Abb. 20 zeigt die gemittelte prozentuale Änderung der Albuminmenge im Urin von Gruppe A (n=4). Der Mittelwert der Basismessungen ist als Nullpunkt definiert. Daher entspricht er einer prozentualen Abweichung von 0%.

#### 4.1.4. Die Fruktosaminspiegel der Einzelmesszeitpunkte

Die durchschnittlichen Fruktosaminspiegel steigen während der Vitamin-E-Gabe gegenüber dem Basiswert an. Der Anstieg ist nicht statistisch signifikant.

Die Fruktosaminwerte unter der Vitamin-E+C-Gabe zeigen keinen einheitlichen Verlauf. Sie steigen und fallen abwechselnd. Die Werte ohne Supplementierung während der Kontrolle liegen auf Basisniveau. Unter erneuter Vitamin-E-Gabe steigen die Fruktosaminwerte über das Kontrollniveau an. Sämtliche Messwerte unterscheiden sich nicht signifikant vom Basiswert.

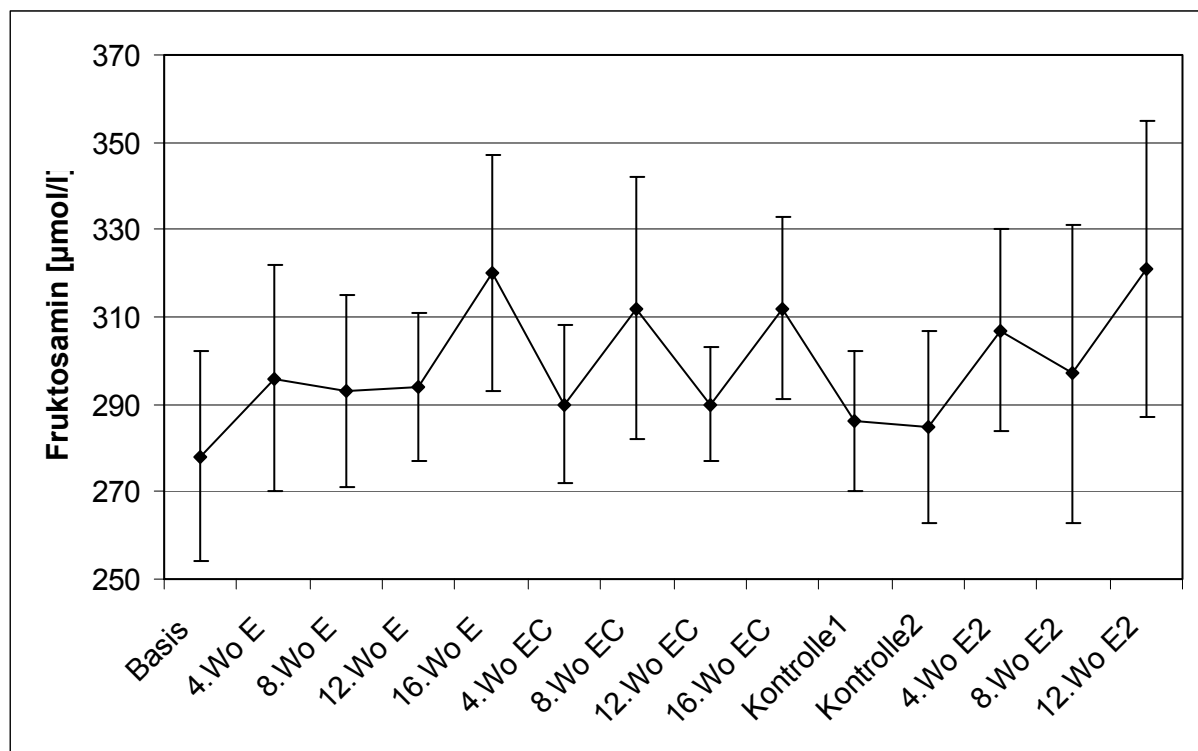


Abb. 21 zeigt die Serumfruktosaminwerte von Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Fruktosaminwerte an.

#### 4.1.5. Die gemittelten Fruktosaminspiegel

Der durchschnittliche Fruktosaminwert während der Vitamin-E-Supplementierung steigt gegenüber dem Basiswert an. Unter der kombinierten Vitamingabe liegt der Fruktosaminspiegel über dem Basiswert, jedoch unter dem der Vitamin-E-Gabe.

Der durchschnittliche Wert während der Kontrolle sinkt gegenüber denen der Supplementierung. Unter der erneuten alleinigen Vitamin-E-Supplementierung steigt der Fruktosaminspiegel an.

Sämtliche Messwerte können nicht statistisch gesichert werden.

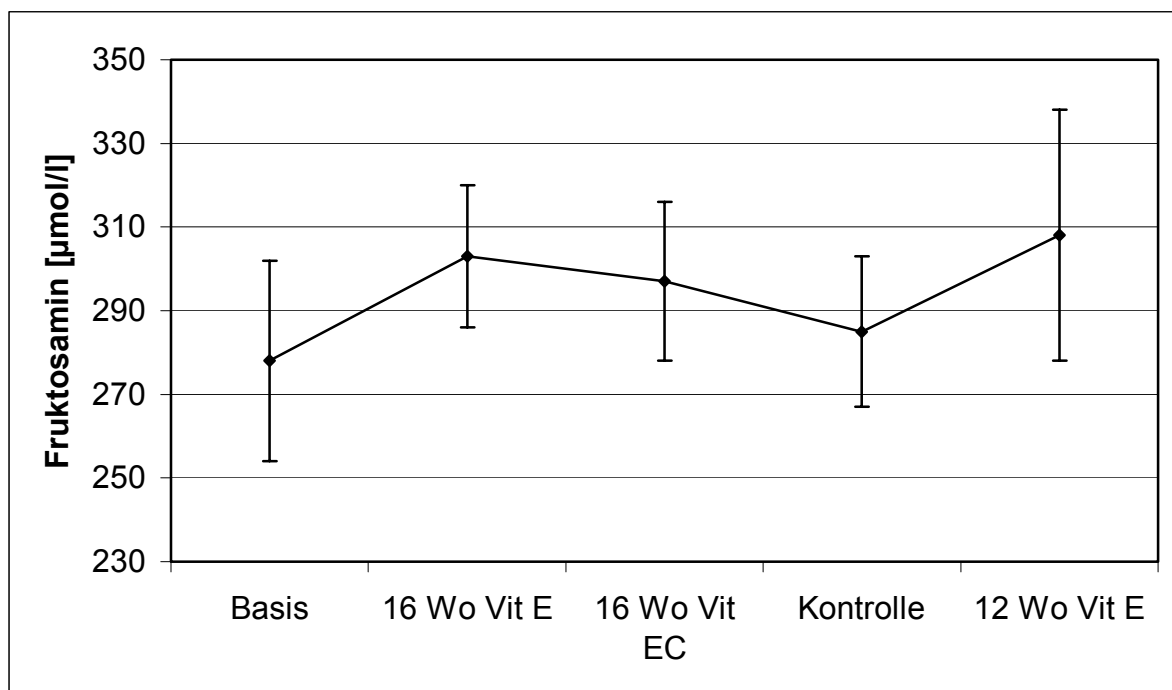


Abb. 22 zeigt die gemittelten Serumfruktosaminwerte von Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Fruktosaminwerte an.

#### 4.1.6. Die HbA<sub>1c</sub>-Werte der Einzelmesszeitpunkte

Die HbA<sub>1c</sub>-Werte zeigen während der Vitamin-E-Gabe gegenüber dem Basiswert einen langsamen Rückgang.

Sie steigen unter der Vitamin-E+C-Gabe in den ersten 4 Wochen an, um dann gleichmäßig zu sinken. Die Werte ohne Supplementierung liegen während der Kontrolle über denen der Supplementierung. Unter erneuter Vitamin-E-Gabe steigen die HbA<sub>1c</sub>-Werte weiter. Sämtliche Messwerte bis auf 8.Wo E und 16.Wo EC mit  $p < 0,05$  unterscheiden sich nicht signifikant vom Basiswert.

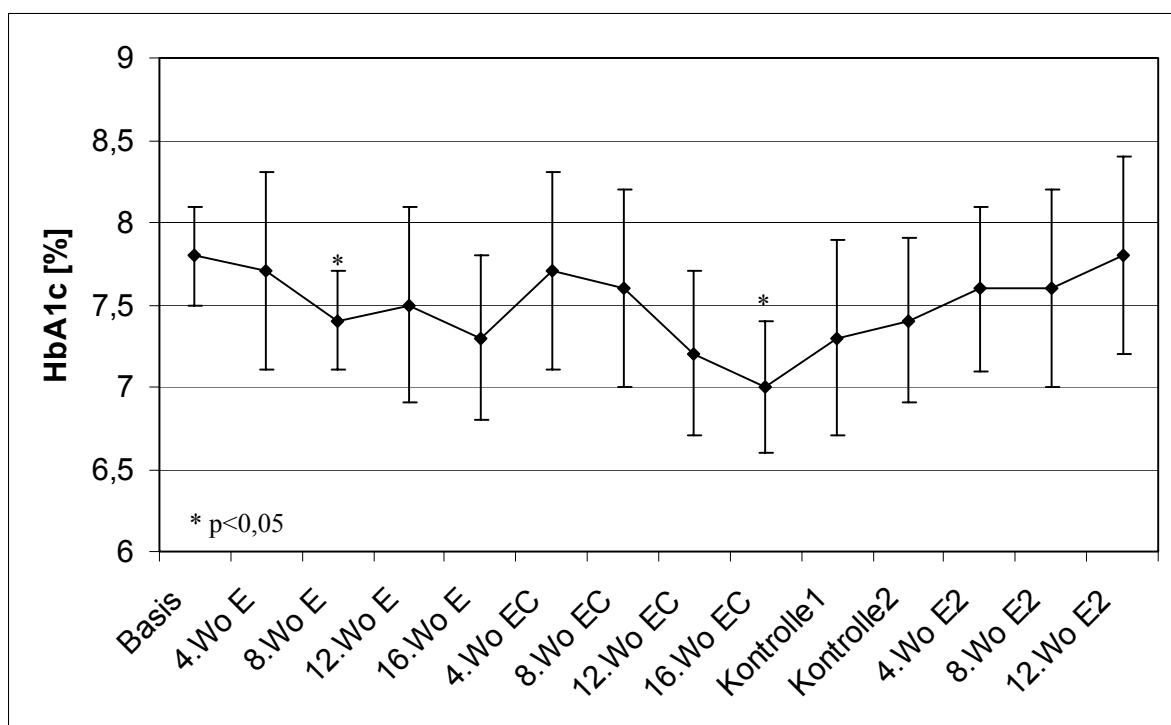


Abb. 23 zeigt die Plasma-HbA<sub>1c</sub>-Werte von Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

#### 4.1.7. Die gemittelten HbA<sub>1c</sub>-Werte

Die Werte des durchschnittlichen HbA<sub>1c</sub> sinken im Verlauf der Versuchsphase stetig. Der Kontrollwert liegt unterhalb des Basiswertes und den Werten der Vitaminsupplementierung. Der durchschnittliche Wert der zweiten Vitamin-E-Phase liegt oberhalb der Werte der Vitamingabe und dem Kontrollwert.

Dabei konnte weder ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Vitaminsupplementierung und dem Basiswert, noch zwischen Kontrolle und Basiswert sowie den Werten der Versuchsphase gesichert werden.

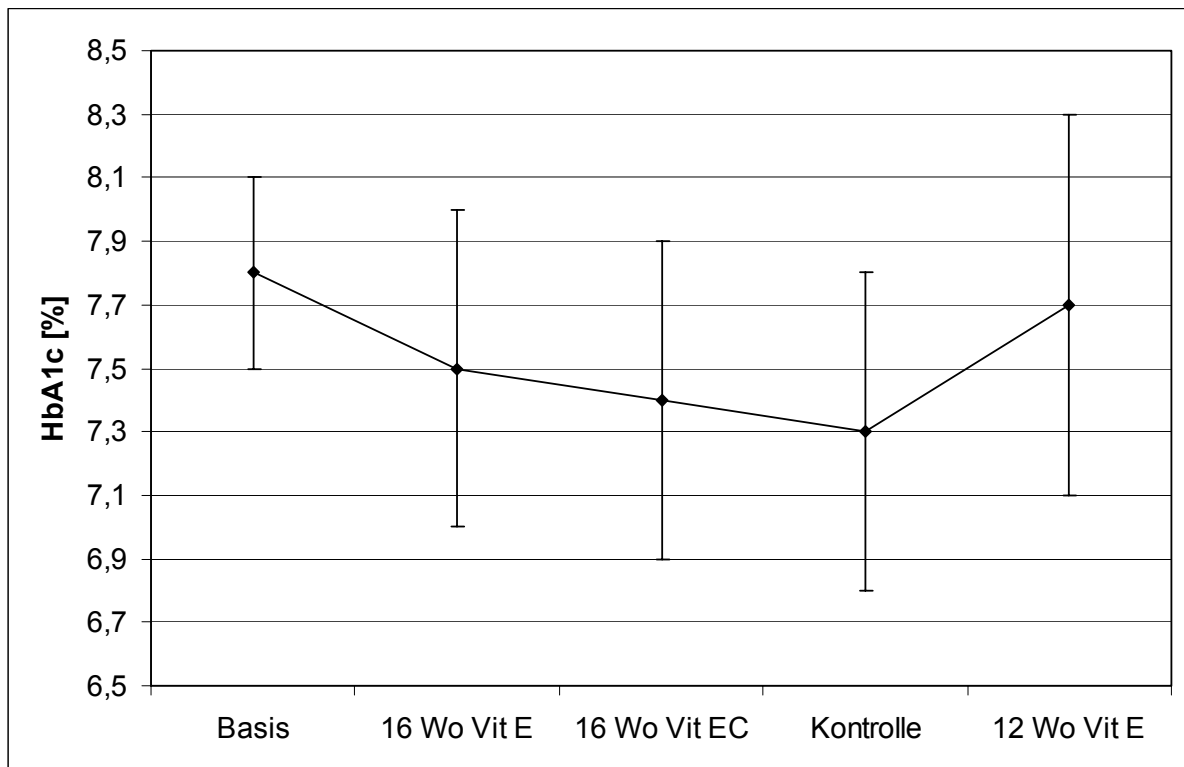


Abb. 24 zeigt die gemittelten Plasma-HbA<sub>1c</sub>-Werte von Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

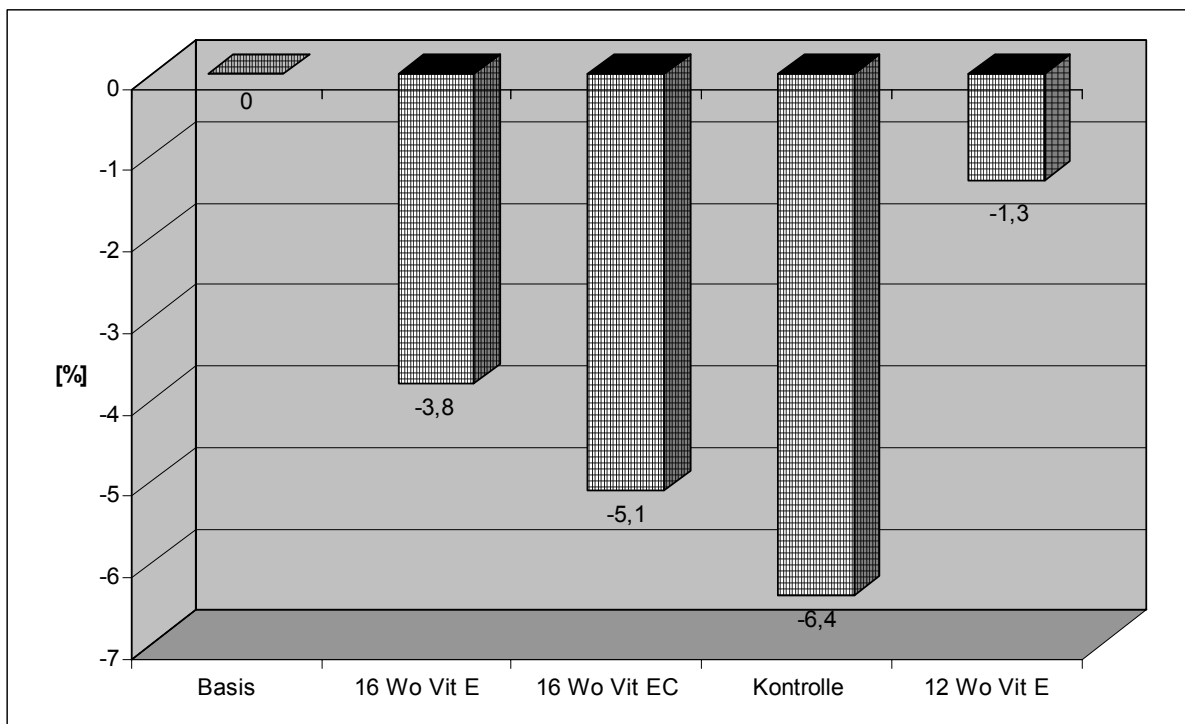
#### 4.1.8. Die prozentuale Änderung der HbA<sub>1c</sub>-Werte

Die durchschnittliche Senkung der HbA<sub>1c</sub>-Werte unter Vitamin-E-Supplementierung beträgt 3,8%.

Am Ende der Vitamin-E- und C-Supplementierung beträgt der gemittelte prozentuale Rückgang des glykosylierten Hämoglobins 5,1%.

Innerhalb von 12 Wochen ohne Vitamingabe sinkt der HbA<sub>1c</sub>-Wert weiter und liegt gemittelt aus zwei Messwerten mit 6,4% unterhalb des Ausgangsniveaus.

Unter erneuter Vitamin-E-Gabe liegt der HbA<sub>1c</sub>-Wert über den Werten der Antioxidantiensupplementierung und um 1,3% unterhalb des Basiswertes.



In der Abb. 25 wird die gemittelte prozentuale Änderung der Plasma-HbA<sub>1c</sub>-Werte der Gruppe A (n=4) dargestellt. Der Mittelwert der Basismessungen ist als Nullpunkt definiert. Daher entspricht er einer prozentualen Abweichung von 0%.

#### 4.1.9. Die Hb-AGE-Werte der Einzelmesszeitpunkte

Die Hb-AGE-Werte zeigen einen starken Rückgang unter Vitamin-E-Gabe. Dabei ist die Hb-AGE-Menge nach 16 Wochen Tokopherolgabe etwas höher als nach 8 Wochen. Unter der zusätzlichen Ascorbatgabe nimmt der durchschnittliche Hb-AGE-Gehalt fast linear bis zur 16. Woche ab.

Der Hb-AGE Wert nach 8-wöchiger Vitamin-E-Einnahme unterscheidet sich statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) vom Basiswert. Die Werte der kombinierten Vitamingabe sind beide mit jeweils  $p < 0,05$  gegenüber dem Basiswert statistisch zu sichern.

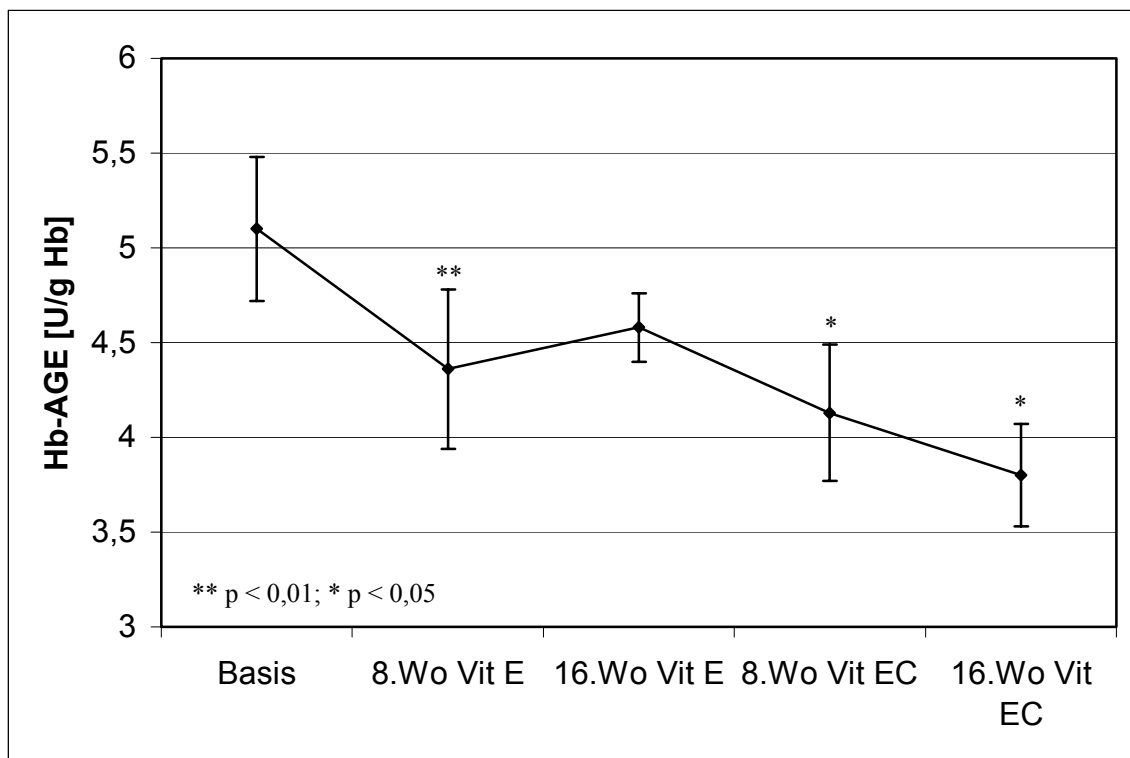


Abb. 26 zeigt die Plasma-Hb-AGE-Werte von Gruppe A ( $n=4$ ) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

#### 4.1.10. Die gemittelten Hb-AGE-Spiegel

Die durchschnittlichen Hb-AGE-Werte zeigen einen starken Rückgang unter der 16-wöchigen Vitamin-E-Gabe und sinken unter zusätzlicher 16-wöchiger Vitamin-C-Gabe weiter. Zu beiden Zeitpunkten lässt sich mit  $p < 0,05$  ein statistisch signifikanter Rückgang gegenüber dem Basiswert sichern.

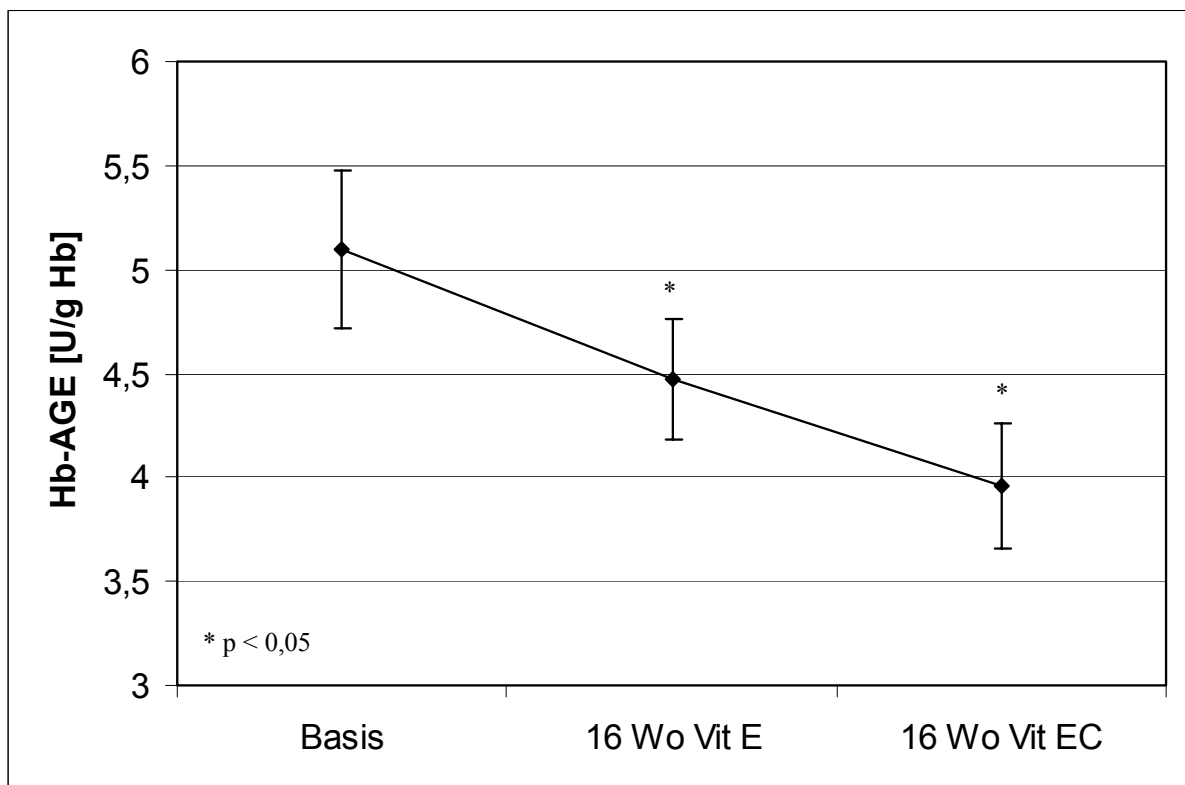


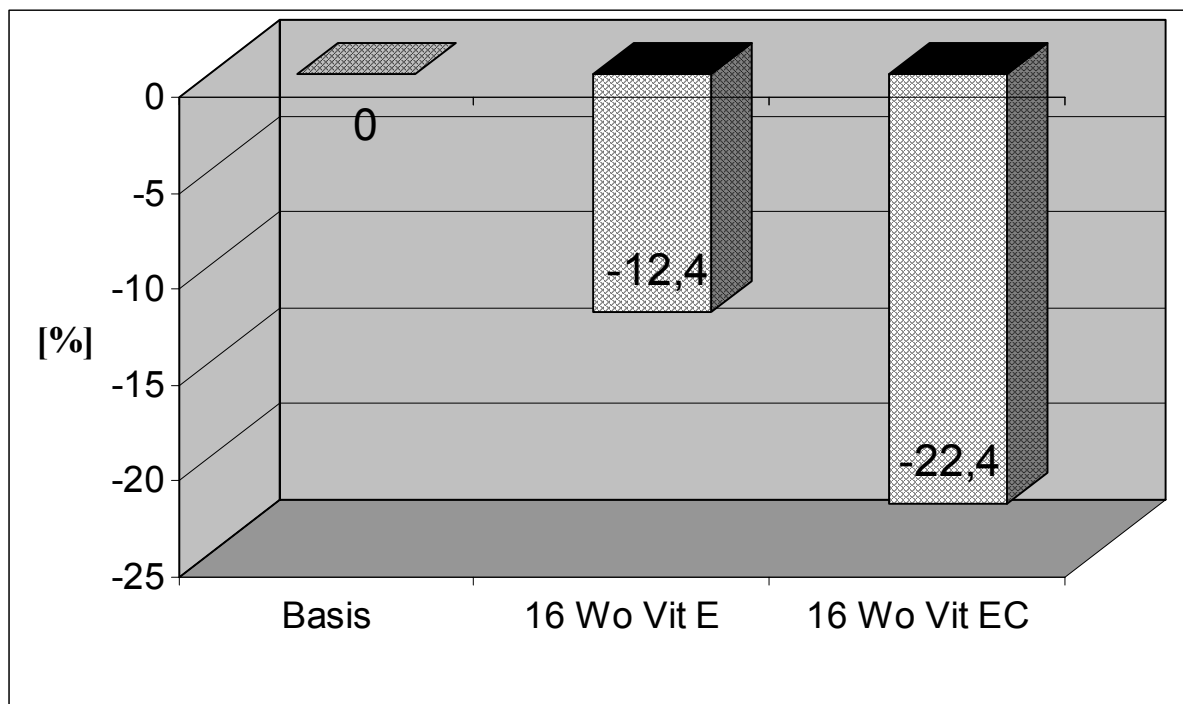
Abb. 27 zeigt die gemittelten Plasma-Hb-AGE-Werte der Gruppe A (n=4) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Hb-AGE-Werte an.



#### 4.1.11. Die prozentuale Änderung der Hb-AGE-Werte

Die durchschnittliche Senkung der Hb-AGE-Werte unter der 16-wöchigen Vitamin-E-Supplementierung beträgt 12,4%. Dem Wert liegt die Mittlung von 4 Messzeitpunkten zugrunde.

Am Ende der 16-wöchigen Supplementierung der Vitamine E und C, beträgt der gemittelte prozentuale Rückgang der Hb-AGE 22,4%.



In der Abb. 28 wird die gemittelte prozentuale Änderung der Plasma-Hb-AGE-Werte von Gruppe A (n=4) dargestellt. Der Mittelwert der Basismessungen ist als Nullpunkt definiert. Deshalb entspricht er einer prozentualen Abweichung von 0%.

#### 4.1.12. Die Blutdruckwerte der Einzelmesszeitpunkte

Die systolischen Werte scheinen während der 16-wöchigen Tokopherolgabe leicht zu fallen, während die Gabe des Vitamin C die Werte scheinbar steigen lässt. Der letzte Wert der Kombinationstherapie liegt demgegenüber wieder auf Basisniveau. Der erste Kontrollwert liegt weit über den anderen, der zweite auf Basisniveau. Unter erneuter Vitamin-E-Gabe sinkt der Blutdruck erst und steigt dann konträr zur ersten Vitamin-E-Gabe leicht an. Nur der Wert nach 16-wöchiger Vitamin-E-Supplementierung unterscheidet sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von dem Basiswert.

Die diastolischen Blutdruckwerte scheinen im Verlauf der Studie zu sinken. Nur zu den Zeitpunkten 8.Wo Vit EC, 16.Wo Vit EC ( $p < 0,05$ ) und 12.Wo Vit EC ( $p = 0,05$ ) ist eine statistische Signifikanz gegenüber der Basis zu sichern.

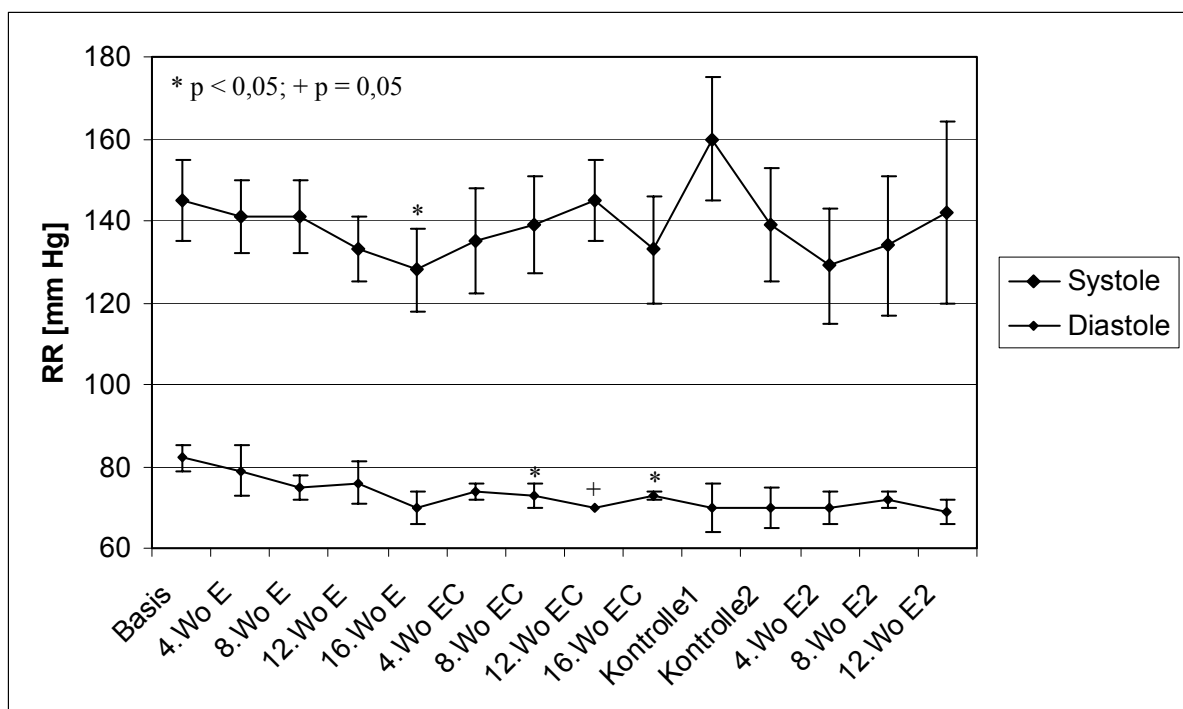


Abb. 29 zeigt die Blutdruckwerte (Systole und Diastole) von Gruppe A ( $n=4$ ) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

#### 4.1.13. Die gemittelten Blutdruckwerte

Die systolischen Blutdruckwerte zeigen sowohl nach 16-wöchiger Tokopherolgabe als auch nach 16-wöchiger Addition von Ascorbat einen leichten Rückgang gegenüber dem Basiswert. In der Kontrollphase ohne Vitamine steigt der systolische Blutdruck leicht an und sinkt nach erneuter Vitamin-E-Gabe wieder leicht ab. Nur der Zeitpunkt 16Wo Vit E unterscheidet sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Basis.

Die diastolischen Blutdruckwerte der Versuchsphasen und der Kontrolle scheinen im Verlauf der Studie zu sinken. Trotzdem unterscheidet sich nur der Zeitpunkt 16Wo Vit EC mit  $p < 0,05$  signifikant von der Basis.

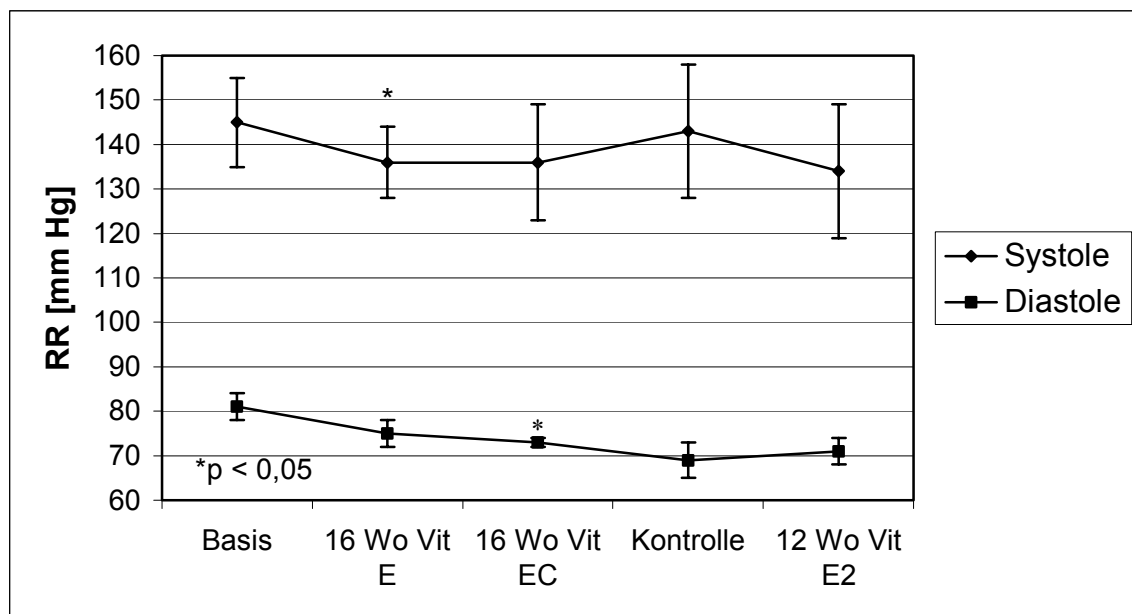


Abb. 30 zeigt die gemittelten Blutdruckwerte (Systole und Diastole) von Gruppe A ( $n=4$ ) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

## 4.2. Die Messergebnisse der Gruppe B

### 4.2.1. Die Albuminausscheidung der Einzelmesszeitpunkte

Die Prüfung der Messzeitpunkte auf Normalverteilung verlief nur zum Zeitpunkt Vit 8.Wo E negativ. Auch zu diesem Zeitpunkt wurde eine Normalverteilung postuliert, da alle anderen Zeitpunkte normal verteilt waren.

Die durchschnittlichen Albuminausscheidungen unter der Vitaminsupplementierung zeigen bis zur 4.Wo EC gegenüber dem Basiswert einen deutlichen Rückgang. Anschließend steigt die Albuminausscheidung leicht an. Zu keinem Messzeitpunkt konnte gegenüber dem Basiswert eine statistische Signifikanz gesichert werden.

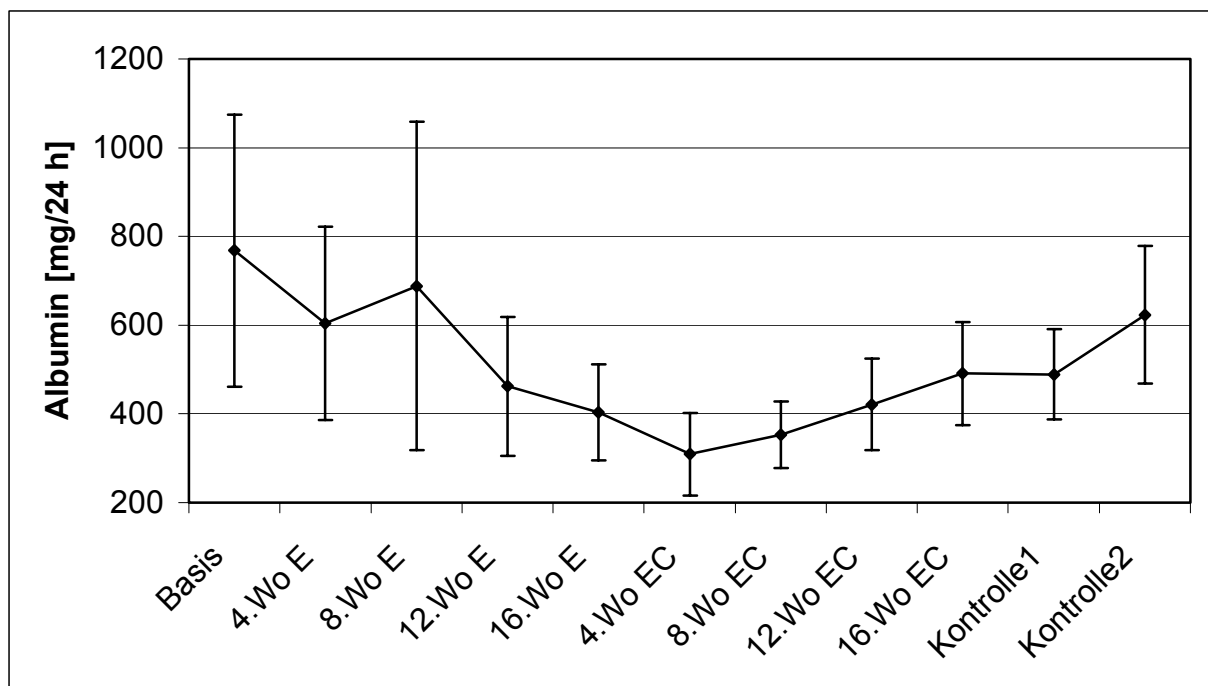


Abb. 31 zeigt die Urinalbuminmenge von Gruppe B (n=8). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Albuminausscheidung an.

#### 4.2.2. Die gemittelte Albuminausscheidung

Die durchschnittlichen Messwerte der Albuminausscheidung sind zu allen Zeitpunkten normal verteilt.

Die durchschnittlichen Albuminausscheidungen sowohl der 16-wöchigen Tokopherolgabe als auch der 16-wöchigen Vitamin-E- und C-Gabe zeigen gegenüber dem Basiswert einen auffälligen Rückgang, welcher jedoch nicht statistisch gesichert werden konnte.

In der Kontrollphase steigt die durchschnittliche Albuminausscheidung über die der Verumphasen, bleibt aber unterhalb des Basiswertes. Der Kontrollwert unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant vom Basiswert.

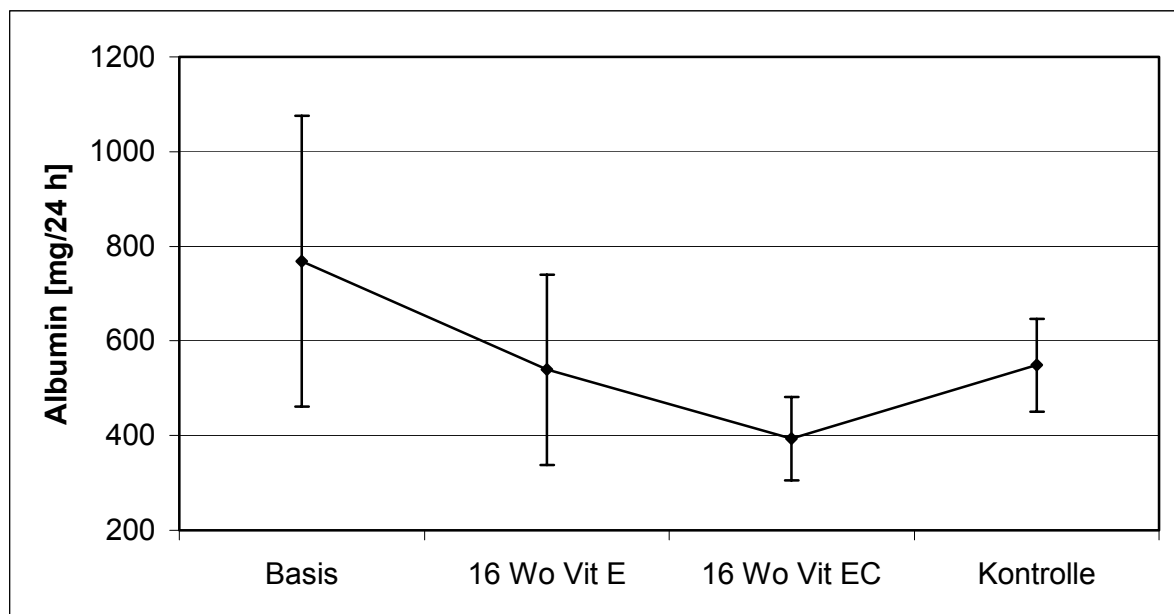


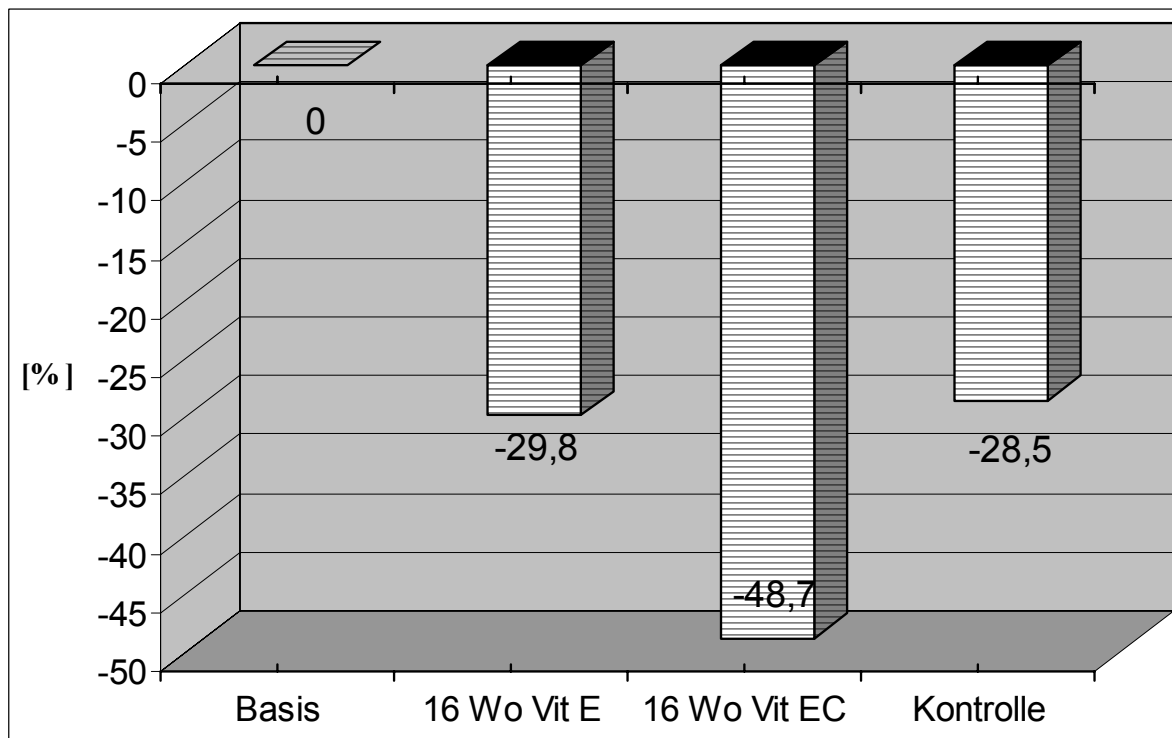
Abb. 32 zeigt die gemittelte Urinalbuminausscheidung von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Albuminausscheidung an.

#### 4.2.3. Die prozentuale Änderung der gemittelten Albuminausscheidung

Die durchschnittliche Senkung der Albuminausscheidung nach 16 Wochen unter Vitamin-E-Supplementierung beträgt im Vergleich zum Basiswert 29,8%. Dem Wert liegt die Mittlung von 4 Messzeitpunkten zugrunde.

Am Ende der 16-wöchigen Vitamin-E- und C-Supplementierung beträgt der gemittelte prozentuale Rückgang der Albuminausscheidung 48,7%.

Innerhalb von 12 Wochen ohne Vitamingabe erhöht sich die Albuminausscheidung und liegt gemittelt aus zwei Messwerten mit 28,5% unterhalb des Ausgangsniveaus.



In der Abb. 33 wird die gemittelte prozentuale Änderung der durchschnittlichen Urinalbuminausscheidung von Gruppe B (n=8) dargestellt. Der Mittelwert der Basismessungen ist als Nullpunkt definiert. Er entspricht einer prozentualen Abweichung von 0%.

#### 4.2.4. Die Fruktosaminspiegel der Einzelmesspunkte

Die Fruktosaminwerte sind zu jedem Zeitpunkt in der Versuchs- und Kontrollphase normal verteilt.

Die durchschnittlichen Fruktosaminwerte der insgesamt 32-wöchigen Versuchsphase und der Kontrollphase zeigen gegenüber dem Basiswert nach einem ersten Anstieg zum Zeitpunkt 4.Wo VitE einen allmählichen Abfall. Dieser Abfall wird nur zum Zeitpunkt 8.Wo und 16.Wo EC unterbrochen. Es kann zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz gegenüber dem Basiswert gesichert werden. Auch die Kontrollzeitpunkte unterscheiden sich nicht signifikant von der Höhe der Messwerte während der Versuchsphase und der Basis.

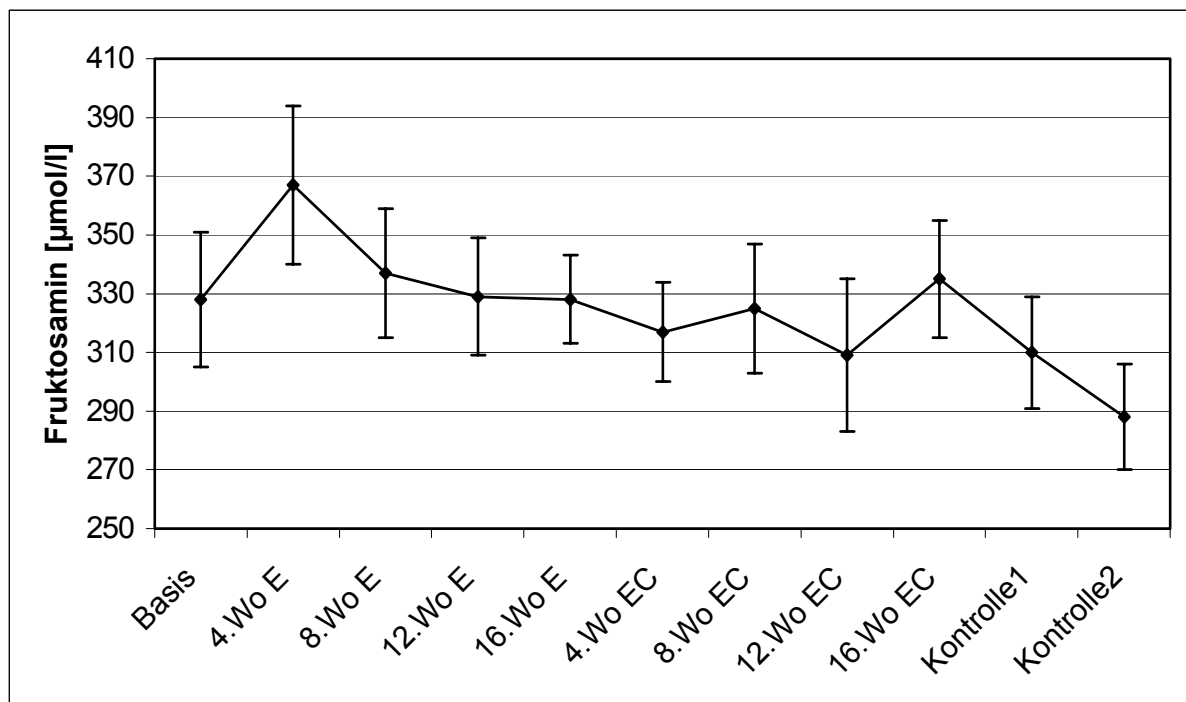


Abb. 34 zeigt die Serum Fruktosaminwerte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Fruktosaminwerte an.

#### 4.2.5. Die gemittelten Fruktosaminspiegel

Die Werte der gemittelten Fruktosaminspiegel sind zu jedem Messzeitpunkt der Studie normal verteilt.

Der durchschnittliche Spiegel zeigt unter Vitamin-E-Gabe einen leichten Anstieg. Unter der Kombinationstherapie fällt er auf die Höhe des Basiswertes ab. Der Kontrollwert sinkt unter die Verumwerte.

Es kann zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber dem Basiswert gesichert werden.

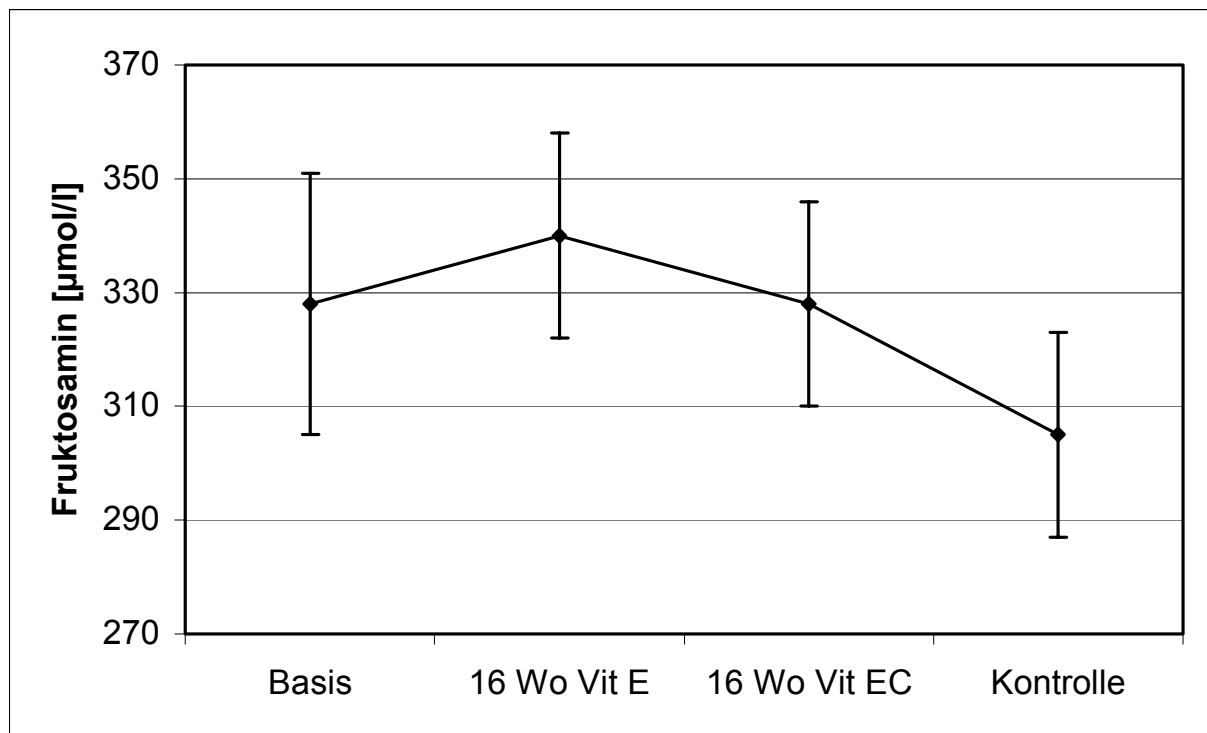


Abb. 35 zeigt die gemittelten Serum-Fruktosaminwerte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Fruktosaminwerte an.



#### 4.2.6. Die HbA<sub>1c</sub>-Werte der Einzelmesszeitpunkte

Die HbA<sub>1c</sub>-Werte sind zu jedem Messzeitpunkt der Studie normal verteilt.

Die Werte während der Vitamin-E- bzw. Vitamin-E- und C-Gabe zeigen gegenüber dem Basiswert eine kontinuierliche Abnahme. In der Kontrollphase steigt der Wert erst an und sinkt zum zweiten Messzeitpunkt erneut.

Alle Messwerte der Versuchsphase mit Vitaminsupplementierung unterscheiden sich nicht signifikant vom Basiswert. Bei den Kontrollwerten ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied gegenüber den anderen Werten zu sichern.

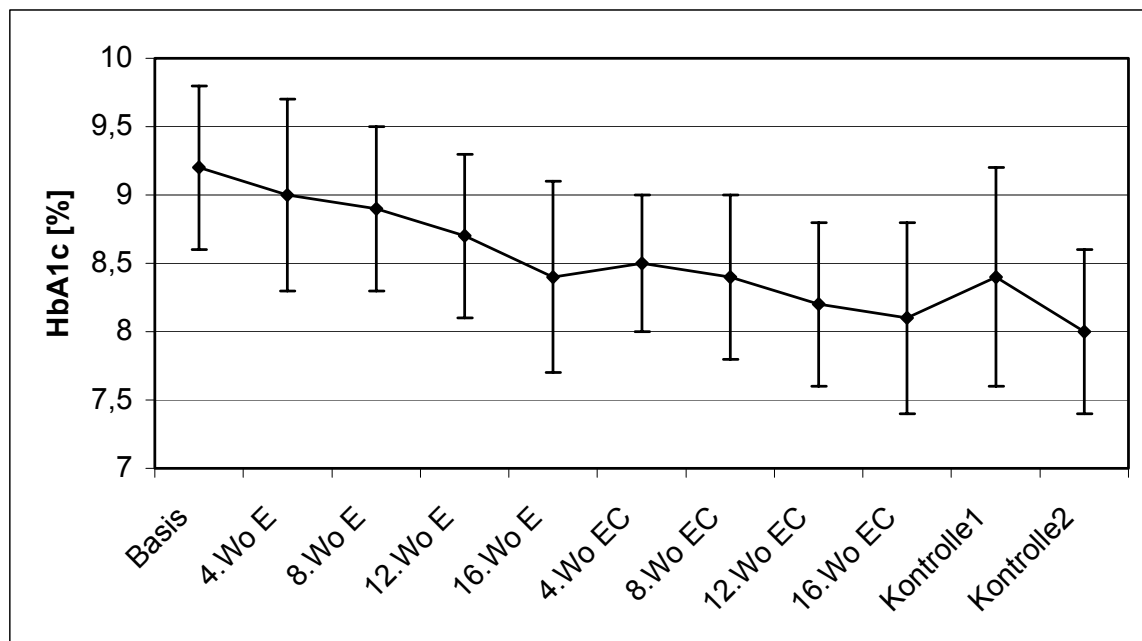


Abb. 36 zeigt die Plasma-HbA<sub>1c</sub>-Werte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

#### 4.2.7. Die gemittelten HbA<sub>1c</sub>-Werte

Die gemittelten Messwerte sind zu jedem Messzeitpunkt der Studie normal verteilt.

Die durchschnittlichen HbA<sub>1c</sub>-Werte fallen unter Vitamin-E-Gabe und der Vitamin-E- und C-Gabe linear und deutlich ab. Der durchschnittliche Messwert der Kontrollphase liegt über dem letzten Verumwert. Sowohl nach 16 Wochen Vitamin-E-Gabe als auch nach 16-wöchiger Kombinationsgabe konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zum Basiswert gesichert werden. Auch die Kontrolle unterschied sich nicht signifikant von den Zeitpunkten der Versuchsphase und dem Basiswert.

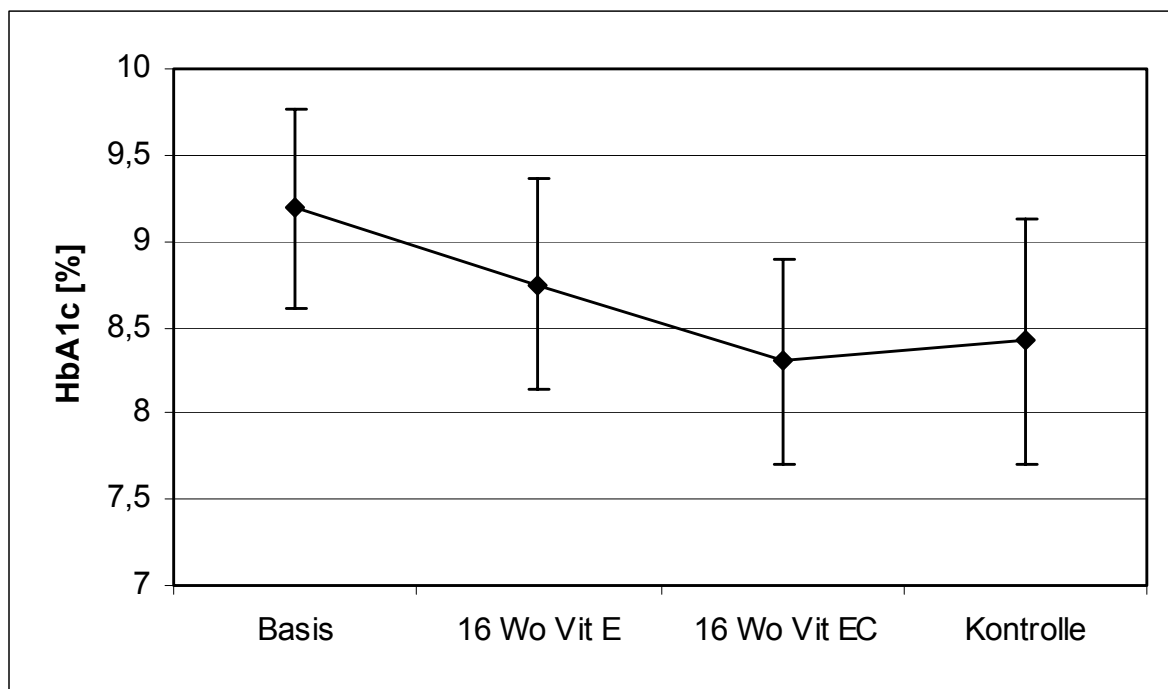


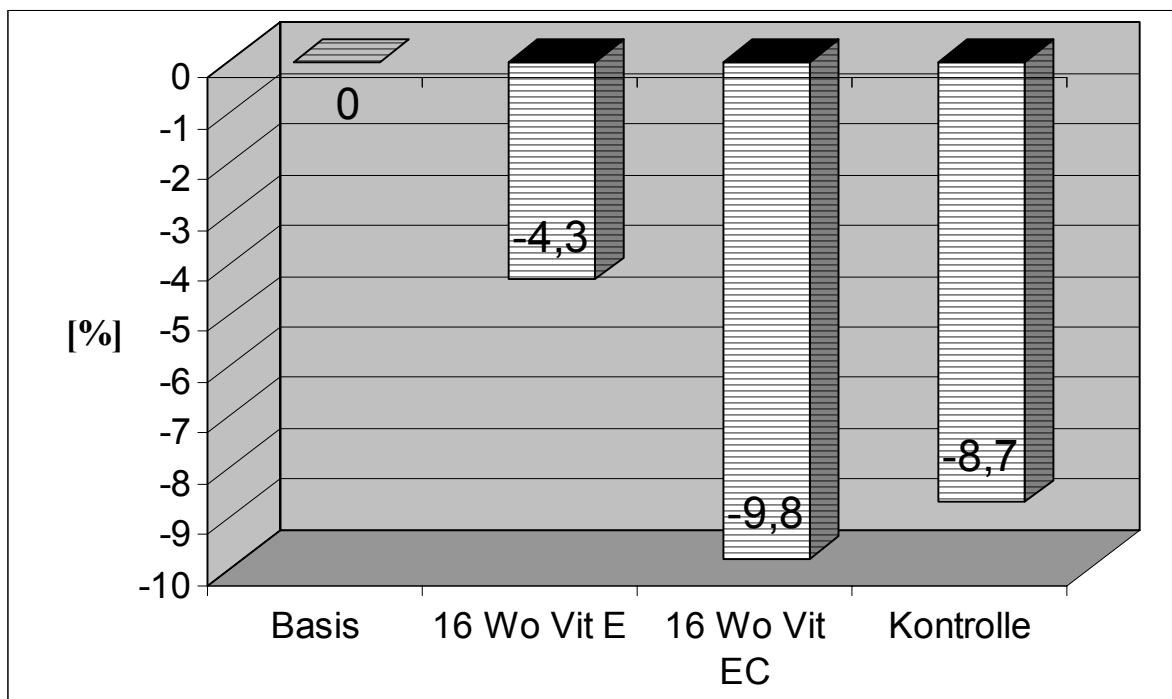
Abb. 37 zeigt die gemittelten Plasma-HbA<sub>1c</sub>-Werte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

#### 4.2.8. Die prozentuale Änderung der gemittelten HbA<sub>1c</sub>-Werte

Die Senkung der durchschnittlichen HbA<sub>1c</sub>-Werte unter 16-wöchiger Vitamin-E-Supplementierung beträgt 4,3%. Dem Wert liegt die Mittlung von 4 Messzeitpunkten zugrunde.

Am Ende der 16-wöchigen Vitamin-E- und C-Supplementierung beträgt der gemittelte prozentuale Rückgang des glykosylierten Hämoglobins 9,8%.

Innerhalb von 12 Wochen ohne Vitamingabe erhöht sich der HbA<sub>1c</sub>-Wert und liegt gemittelt aus zwei Messwerten mit 8,7% unterhalb des Ausgangsniveaus.



In der Abb. 38 wird die gemittelte prozentuale Änderung der Plasma-HbA<sub>1c</sub>-Werte von Gruppe B (n=8) dargestellt. Der Mittelwert der Basismessungen ist als Nullpunkt definiert. Daher entspricht er einer prozentualen Abweichung von 0%.

#### 4.2.9. Die Blutdruckwerte der Einzelmesszeitpunkte

Die systolischen Blutdruckwerte sind zu jedem Messzeitpunkt der Studie normal verteilt, die diastolischen bis auf die Messpunkte 8.Wo Vit EC und 12.Wo Vit EC ebenfalls. Sie werden jedoch für die weitere statistische Auswertung als normal verteilt postuliert.

Die systolischen Blutdruckwerte zeigen während der gesamten Studiendauer keinen einheitlichen Verlauf. Sie unterscheiden sich bis auf den Zeitpunkt 12.Wo Vit EC mit  $p < 0,01$  nicht signifikant vom Basiswert.

Die diastolischen Blutdruckwerte der Versuchs- und Kontrollphase scheinen leicht zu sinken. Trotzdem unterscheiden sich die Messwerte bis auf die Zeitpunkte 4.Wo Vit EC mit  $p < 0,01$  und 16.Wo Vit EC mit  $p < 0,05$  nicht signifikant von der Höhe des Ausgangswertes.

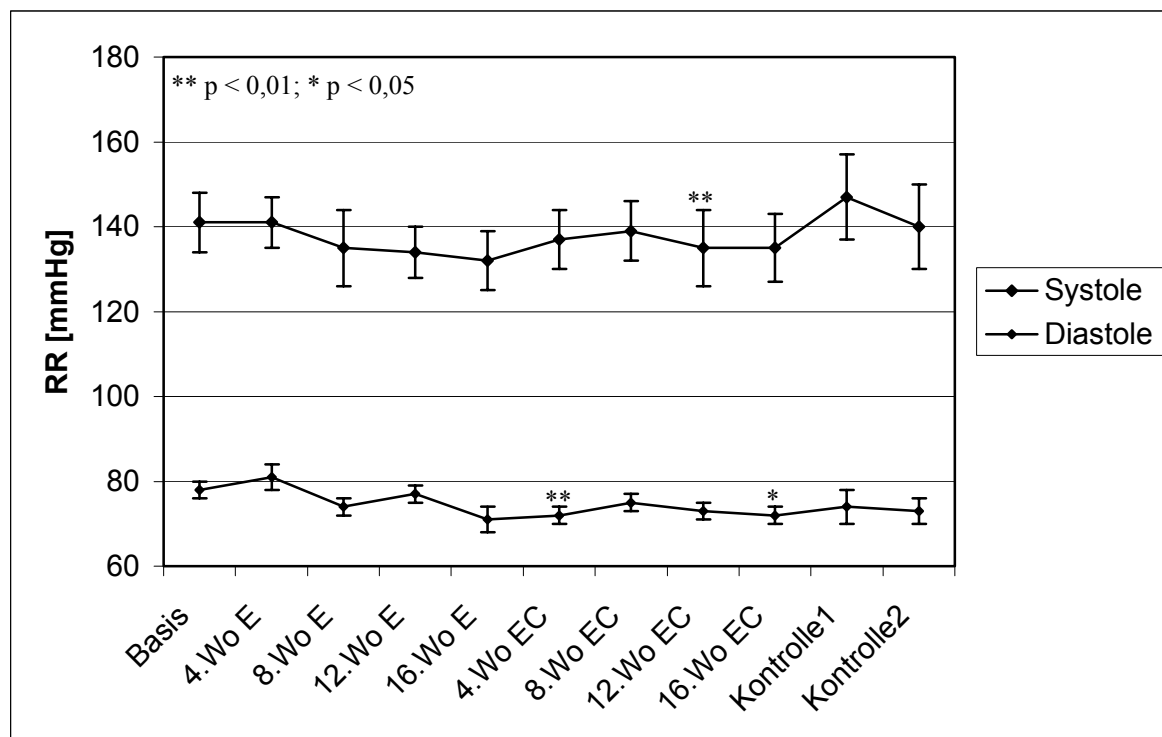


Abb. 39 zeigt die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

#### 4.2.10. Die gemittelten Blutdruckwerte

Die Blutdruckwerte aller gemittelten Messzeitpunkte sind normal verteilt.

Die systolischen Blutdruckwerte der Versuchsphase zeigen unter Vitamingabe einen leichten Abfall der Druckhöhe. Der durchschnittliche Wert der Kontrollphase liegt auf der Höhe des Basiswertes. Jedoch kann zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Versuchsphase bzw. dem Kontrollwert und dem Basiswert gesichert werden.

Die diastolischen Blutdruckwerte der Versuchs- und Kontrollphase scheinen im Verlauf der Studie zu sinken. Trotzdem unterscheidet sich nur der Zeitpunkt 16Wo Vit EC mit  $p < 0,05$  signifikant von dem Basiswert.

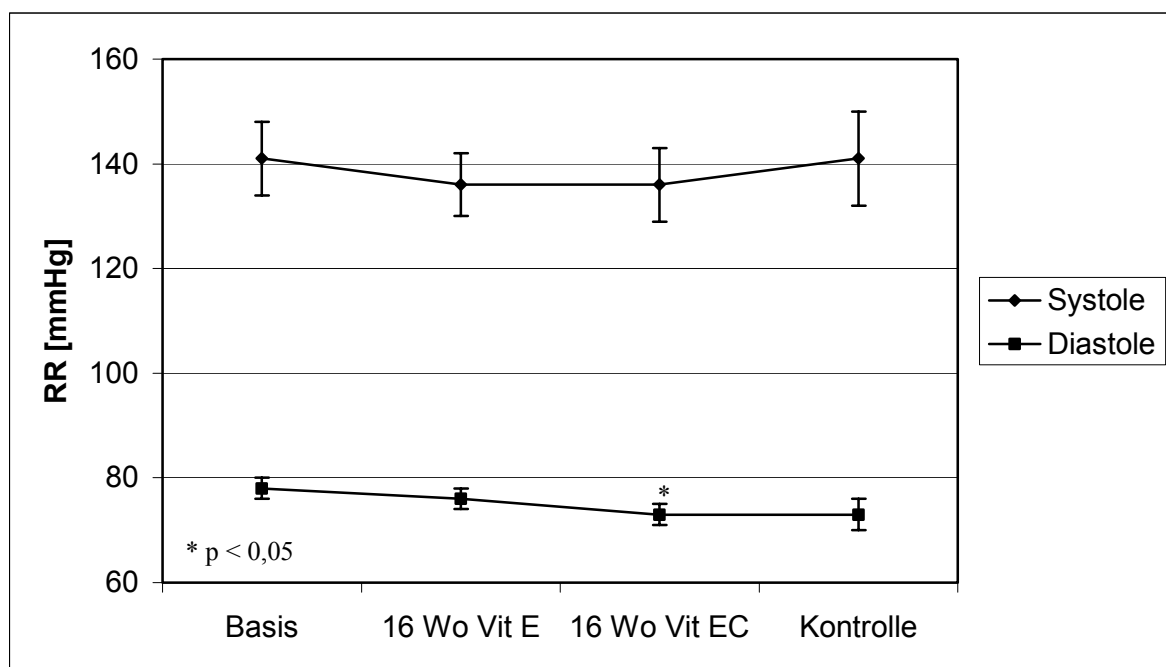


Abb. 40 zeigt die gemittelten Blutdruckwerte (Systole und Diastole) von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messwerte an.

### 4.3. Die Messergebnisse der Gruppe C

#### 4.3.1. Die Albuminausscheidung der Einzelmesszeitpunkte

Alle während der Studie gemessenen Albuminausscheidungen sind normal verteilt.

Die Ausscheidungen unter der Vitamin-E-Gabe nehmen in den ersten 8 Wochen ab und steigen in den zweiten 8 Wochen an. Unter der Kombinationstherapie scheint sich die Albuminausscheidung nach einem ersten Rückgang langsam zu erhöhen. Ohne Vitamingabe steigt die Albuminausscheidung über den Basiswert an. Nur die Zeitpunkte 4. und 8. Wo Vit E und 4. Wo Vit EC sind mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Basiswert signifikant unterschiedlich. Die Werte 12. Wo Vit E und 12. Wo Vit EC verfehlten das Signifikanzniveau mit  $p = 0,051$  bzw. 0,06 nur knapp.

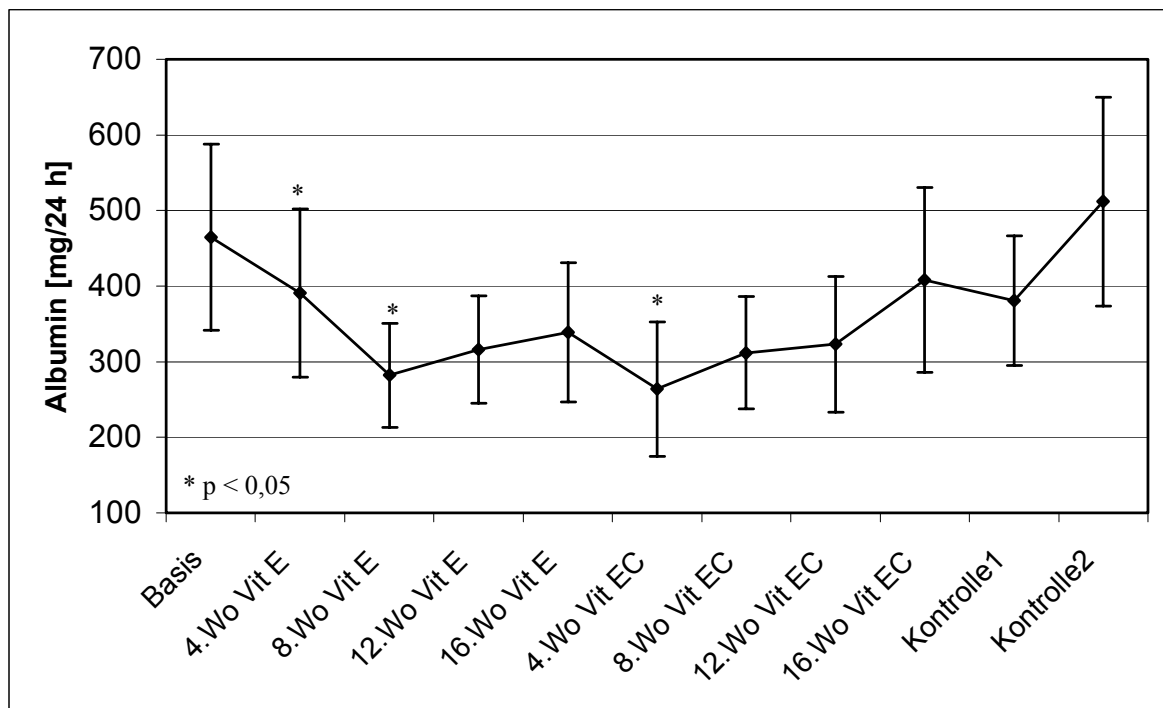


Abb. 41 zeigt die Albuminausscheidung im Urin von Gruppe C (n=10) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Albuminausscheidung an.

#### 4.3.2. Die gemittelte Albuminausscheidung

Die durchschnittlichen Messwerte der Albuminausscheidung sind zu allen Zeitpunkten der Studie normal verteilt.

Die Albuminausscheidungen der Versuchsphase zeigen gegenüber dem Basiswert einen starken Rückgang. Der Zeitpunkt 16Wo Vit E unterscheidet sich statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) vom Basiswert, während der Zeitpunkt 16 Wo Vit EC mit  $p = 0,075$  nicht signifikant ist. Die Albuminausscheidung liegt zu beiden Zeitpunkten mit 321 mg/24 h bzw. 320 mg/24 h auf gleich hohem Niveau mit unterschiedlichem Standardfehler. Der Messwert der Kontrollphase unterscheidet sich nicht signifikant von den Werten der Versuchsphase und dem Basiswert.

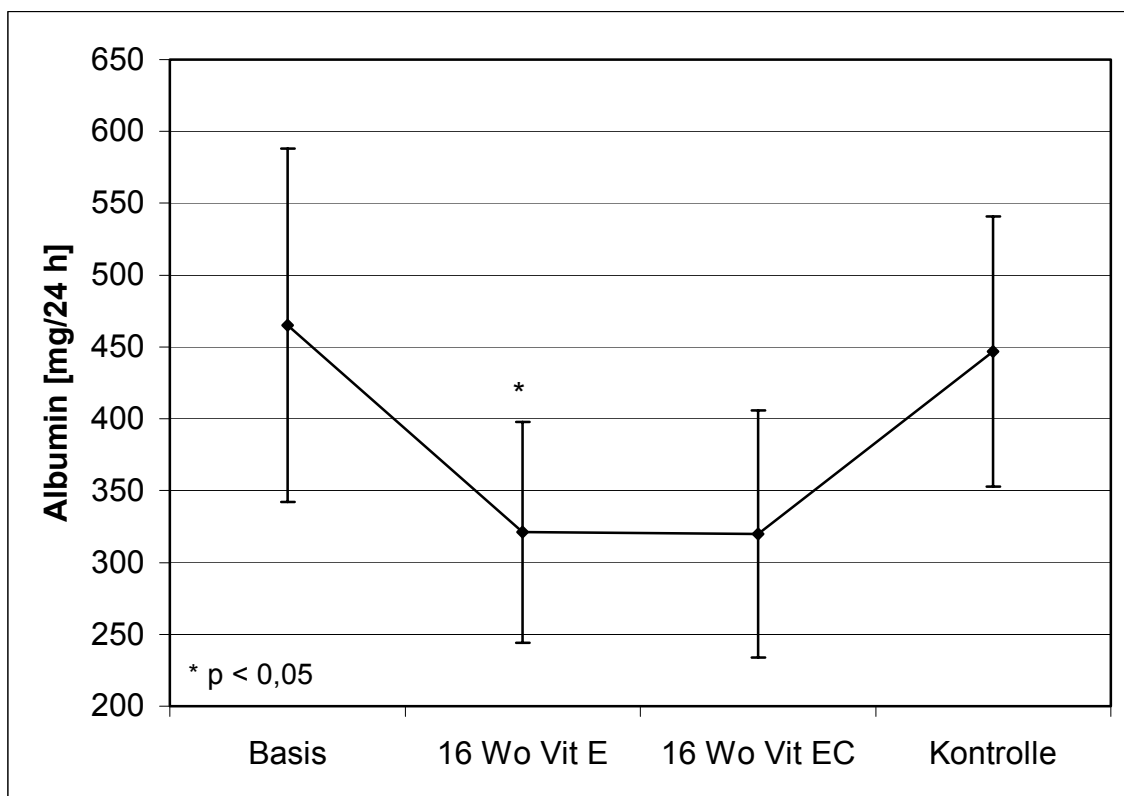


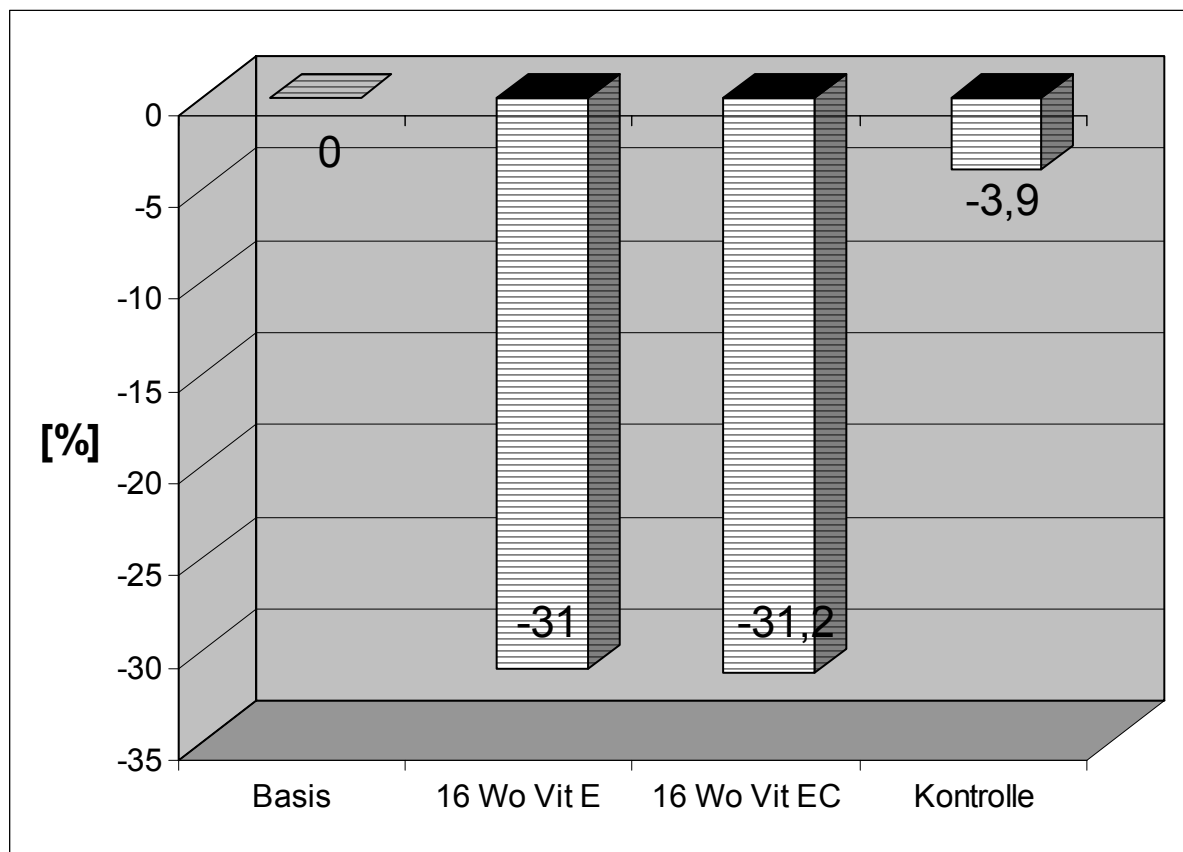
Abb. 42 zeigt die gemittelte Albuminausscheidung im Urin von Gruppe C (n=10) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Albuminausscheidung an.

### 4.3.3. Die prozentuale Änderung der Albuminausscheidung

Die Messwerte der Albuminausscheidung sind zu allen Zeitpunkten normal verteilt.

Die durchschnittliche Senkung der Albuminausscheidung unter 16-wöchiger Vitamin-E-Supplementierung beträgt 31%. Dem Wert liegt die Mittlung von 4 Messzeitpunkten zugrunde. Am Ende der 16-wöchigen Vitamin-E- und C-Supplementierung beträgt der prozentuale Rückgang der Albuminausscheidung 31,2%.

Innerhalb von 12 Wochen ohne Vitamingabe erhöht sich die Albuminausscheidung und liegt gemittelt aus zwei Messwerten mit 3,9% unterhalb des Basiswertes.



In der Abb. 43 wird die gemittelte prozentuale Änderung der durchschnittlichen Urin-Albuminausscheidung von Gruppe C (n=10) dargestellt. Der Mittelwert der Basismessungen ist als Nullpunkt definiert. Er entspricht einer prozentualen Abweichung von 0%.



#### 4.4. Die anderen Messwerte

##### 4.4.1. Der Cholesterinspiegel

Eine Prüfung der Messwerte auf Normalverteilung verläuft positiv, wenn die Spalte mit „X“ gekennzeichnet ist. Wenn ein Zeitpunkt sich statistisch signifikant von dem Basiswert unterscheidet, wird das Signifikanzniveau gekürzt in der Spalte „sig“ angegeben (z. B.:  $05 = p < 0,05$ ).

Eine Prüfung der Zeitpunkte auf Normalverteilung verläuft in der Gruppe B für alle Messwerte positiv, während in der Gruppe A aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte eine Überprüfung nicht möglich ist.

Die durchschnittlichen Cholesterinspiegel zeigen in beiden Patientengruppen einen uneinheitlichen Verlauf. Sie steigen an und sinken im Verlauf der Studie ohne erkennbares Muster. In beiden Gruppen unterscheiden sich sowohl die Messwerte unter Vitamingabe als auch die Kontrollwerte nicht signifikant vom Basiswert.

	Gruppe B (n=8)				Gruppe A (n=4)			
Zeit	mean	std err	norm	sig	mean	std err	Norm	sig
<b>Basis</b>	213	13	X	/	216	24		/
<b>4.WoE</b>	218	13	X	n. s.	203	15		n. s.
<b>8.WoE</b>	208	10	X	n. s.	203	12		n. s.
<b>12.WoE</b>	203	6	X	n. s.	208	8		n. s.
<b>16.WoE</b>	211	12	X	n. s.	208	12		n. s.
<b>4.WoEC</b>	199	13	X	n. s.	208	13		n. s.
<b>8.WoEC</b>	215	7	X	n. s.	213	6		n. s.
<b>12.WoEC</b>	201	9	X	n. s.	186	13		n. s.
<b>16.WoEC</b>	226	14	X	n. s.	226	12		n. s.
<b>Kontr.1</b>	240	21	X	n. s.	224	23		n. s.
<b>Kontr.2</b>	256	41	X	n. s.	217	20		n. s.
<b>4.WoE2</b>					206	18		n. s.
<b>8.WoE2</b>					211	20		n. s.
<b>12.WoE2</b>					220	19		n. s.

Tab. 2 zeigt die Serumcholesterinkonzentrationen im Verlauf der Studie bei Gruppe A und B. Die Einheit der Mittelwerte (mean) und des Standardfehlers (std err) ist: [mg/dl].

#### 4.4.2. Der Triglyzeridspiegel

Eine Prüfung der Messwerte ergibt eine Normalverteilung, wenn die Spalte mit „X“ gekennzeichnet ist. Eine Prüfung der Zeitpunkte auf Normalverteilung verläuft in der Patientengruppen B für jeden Messwert positiv, während in der Gruppe A aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte eine Überprüfung nicht möglich ist.

Wenn ein Zeitpunkt sich statistisch signifikant von dem Zeitpunkt Basis unterscheidet, wird das Signifikanzniveau gekürzt in der Spalte „sig“ angegeben (z. B.: 05 =  $p < 0,05$ ). Die durchschnittlichen Triglyzeridspiegel zeigen in beiden Patientengruppen einen uneinheitlichen Verlauf. Sie steigen an und fallen ohne erkennbares Muster. Nur zu dem Zeitpunkt 4.Wo Vit EC in der Gruppe B sowie 12.Wo Vit E2 in der Gruppe A unterscheiden sich die Triglyzeridkonzentrationen mit  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$  statistisch signifikant von dem Basiswert.

	Gruppe B (n=8)				Gruppe A (n=4)			
Zeit	mean	std err	norm	sig	Mean	std err	norm	Sig
<b>Basis</b>	183	34	X	/	163	22		/
<b>4.WoE</b>	268	83	X	n. s.	254	85		n. s.
<b>8.WoE</b>	155	22	X	n. s.	137	22		n. s.
<b>12.WoE</b>	145	26	X	n. s.	124	25		n. s.
<b>16.WoE</b>	157	35	X	n. s.	141	46		n. s.
<b>4.WoEC</b>	151	37	X	05	130	24		n. s.
<b>8.WoEC</b>	177	32	X	n. s.	149	40		n. s.
<b>12.WoEC</b>	149	27	X	n. s.	112	34		n. s.
<b>16.WoEC</b>	141	16	X	n. s.	117	27		n. s.
<b>Kontr.1</b>	174	38	X	n. s.	119	28		n. s.
<b>Kontr.2</b>	193	36	X	n. s.	127	23		n. s.
<b>4.WoE2</b>					126	6		n. s.
<b>8.WoE2</b>					134	16		n. s.
<b>12.WoE2</b>					123	22		01

Tab. 3 zeigt die Serumtriglyzeridkonzentrationen im Verlauf der Studie bei Gruppe A und B. Die Einheit der Mittelwerte (mean) und des Standardfehlers (std err) ist: [mg/dl].

#### 4.4.3. Der HDL-Cholesterinspiegel

Die Messwerte eines Zeitpunktes sind normal verteilt, wenn die Spalte mit „X“ gekennzeichnet ist. Eine Prüfung der Zeitpunkte auf Normalverteilung verläuft in der Gruppe B bei allen Messwerten positiv, während in der Gruppe A aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte eine Überprüfung nicht möglich ist.

Wenn ein Zeitpunkt sich statistisch signifikant von dem Zeitpunkt Basis unterscheidet, wird das Signifikanzniveau ebenfalls gekürzt in der Spalte „sig“ angegeben (Bsp: 05 =  $p < 0,05$ ). Die durchschnittlichen HDL - Spiegel zeigen in beiden Patientengruppen einen uneinheitlichen Verlauf. Dabei lässt sich während der Studie kein Muster feststellen.

Nur zu dem Zeitpunkt 12.Wo Vit EC und Kontr.1 in der Gruppe A unterscheiden sich die HDL-Konzentrationen mit  $p < 0,05$  statistisch signifikant vom Basiswert.

	Gruppe B (n=8)				Gruppe A (n=4)			
Zeit	mean	std err	norm	sig	mean	std err	norm	Sig
<b>Basis</b>	41	4	X	/	40	8		/
<b>4.WoE</b>	37	4	X	n. s.	33	3		n. s.
<b>8.WoE</b>	42	4	X	n. s.	41	6		n. s.
<b>12.WoE</b>	38	4	X	n. s.	39	6		n. s.
<b>16.WoE</b>	41	5	X	n. s.	40	10		n. s.
<b>4.WoEC</b>	40	4	X	n. s.	36	6		n. s.
<b>8.WoEC</b>	43	5	X	n. s.	42	5		n. s.
<b>12.WoEC</b>	45	6	X	n. s.	44	8		05
<b>16.WoEC</b>	46	7	X	n. s.	44	9		n. s.
<b>Kontr.1</b>	48	6	X	n. s.	48	8		05
<b>Kontr.2</b>	44	7	X	n. s.	41	6		n. s.
<b>4.WoE2</b>					40	4		n. s.
<b>8.WoE2</b>					42	6		n. s.
<b>12.WoE2</b>					45	7		n.s.

Tab. 4 zeigt die Serum-HDL-Cholesterinkonzentrationen im Verlauf der Studie. Die Einheit der Mittelwerte (mean) und des Standardfehlers (std err) ist: [mg/dl].

#### 4.4.4. Der Vitamin-C-Spiegel

Sind die Messwerte normal verteilt, ist dies durch ein „X“ in der Tabelle markiert. Eine Prüfung der Zeitpunkte auf Normalverteilung verläuft in der Gruppe B bis auf die Zeitpunkte 4.Wo Vit E und 8.Wo Vit EC positiv, während in der Gruppe A eine Überprüfung nicht möglich ist.

Wenn ein Zeitpunkt sich statistisch signifikant von dem Basiswert unterscheidet, wird das Signifikanzniveau gekürzt in der Spalte „sig“ angegeben.

Die durchschnittlichen Spiegel zeigen in beiden Patientengruppen einen Anstieg während der Vitamin-C-Gabe. Jedoch konnte dieser Anstieg nur zu folgenden Zeitpunkten statistisch signifikant gesichert werden:

Gruppe B: - 12.+16. Wo Vit E sowie 8.+12. Wo Vit EC mit  $p < 0,05$

Gruppe A: - 12.Wo Vit E mit  $p < 0,01$  und 16.Wo Vit E sowie 8. Wo Vit EC mit  $p < 0,05$

	Gruppe B (n=8)				Gruppe A (n=4)			
Zeit	mean	Std err	norm	sig	mean	std err	norm	Sig
<b>Basis</b>	1,11	0,21	X	/	1,16	0,37		/
<b>4.WoE</b>	1,13	0,19	X	n. s.	1,13	0,37		n. s.
<b>8.WoE</b>	1,26	0,23	-	n. s.	1,42	0,47		n. s.
<b>12.WoE</b>	1,33	0,22	X	05	1,46	0,41		01
<b>16.WoE</b>	1,27	0,22	X	05	1,38	0,42		05
<b>4.WoEC</b>	2,39	0,72	-	n. s.	1,71	0,36		n. s.
<b>8.WoEC</b>	1,84	0,2	X	05	1,93	0,07		05
<b>12.WoEC</b>	1,78	0,26	X	05	1,88	0,28		n. s.
<b>16.WoEC</b>	1,69	0,32	X	n. s.	1,75	0,40		n. s.
<b>Kontr.1</b>	1,16	0,16	X	n. s.	1,13	0,2		n. s.
<b>Kontr.2</b>	1,15	0,15	X	n. s.	1,07	0,17		n. s.
<b>4.WoE2</b>					1,14	0,1		n. s.
<b>8.WoE2</b>					1,17	0,23		n. s.
<b>12.WoE2</b>					1,54	0,67		n. s.

Tab. 5 zeigt die Plasma-Vitamin-C-Konzentrationen im Verlauf der Studie bei Gruppe A und B. Die Einheit der Mittelwerte (mean) und des Standardfehlers (std err) ist: [mg/dl].

#### 4.4.5. Der Vitamin-E-Spiegel

Eine Prüfung der Messwerte eines Zeitpunktes ergibt eine Normalverteilung, wenn die Spalte mit „X“ gekennzeichnet ist. Eine Prüfung der Zeitpunkte auf Normalverteilung verlief in der Gruppe B zu jedem Zeitpunkt der Studie positiv, während in der Gruppe A aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte eine Überprüfung nicht möglich ist.

Die Vitamin-E-Spiegel zeigen in beiden Gruppen einen deutlichen Anstieg während der Versuchsphase mit Vitamin-E- bzw. E+C-Supplementierung. In der Gruppe B unterschieden sich folgende Werte signifikant vom Basiswert:

- mit  $p < 0,001$ : 4. Wo, 8. Wo, 12. Wo, 16. Wo VitE und 4. Wo + 16. Wo Vit EC
- mit  $p < 0,01$ : 8. Wo, 12. Wo Vit EC und Kontrolle1.

In der Gruppe A unterschieden sich folgende Werte signifikant vom Basiswert:

- mit  $p < 0,01$ : 4. Wo, 8. Wo, 12. Wo, 16. Wo Vit E, 4. Wo Vit EC und 12. Wo Vit E2
- mit  $p < 0,05$ : 8. Wo, 16. Wo Vit EC, Kontrolle1 und 4. Wo, 8. Wo, 12. Wo Vit E2

	Gruppe B (n=8)				Gruppe A (n=4)			
Zeit	mean	std err	norm	sig	Mean	std err	norm	sig
<b>Basis</b>	1,53	0,09	X	/	1,48	0,13		/
<b>4.WoE</b>	4,23	0,35	X	001	3,93	0,43		01
<b>8.WoE</b>	4,36	0,55	X	001	4,66	0,52		01
<b>12.WoE</b>	4,23	0,41	X	001	3,85	0,51		01
<b>16.WoE</b>	4,67	0,56	X	001	4,16	0,53		01
<b>4.WoEC</b>	4,28	0,50	X	001	4,3	0,53		01
<b>8.WoEC</b>	4,45	0,73	X	01	4,41	0,80		05
<b>12.WoEC</b>	4,58	0,78	X	01	4,21	1,02		n. s.
<b>16.WoEC</b>	4,56	0,56	X	001	4,45	0,59		05
<b>Kontr.1</b>	2,01	0,15	X	01	2,09	0,23		05
<b>Kontr.2</b>	1,76	0,16	X	n. s.	1,94	0,17		n. s.
<b>4.WoE2</b>					5,01	0,82		05
<b>8.WoE2</b>					4,47	0,75		05
<b>12.WoE2</b>					4,69	0,63		01

Tab. 6 zeigt die Plasma Vitamin-E-Konzentrationen im Verlauf der Studie bei Gruppe A und B. Die Einheit der Mittelwerte (mean) und des Standardfehlers (std err) ist: [mg/g Gesamtlipide].

#### 4.4.6. Die Blutglukose

In der folgenden Tabelle sind die Messwerte der Blutzuckereigenmessung von zwei Probanden aufgeführt. Die Messwerte sind zu jedem Zeitpunkt normal verteilt.

Bei Proband 1 sind die Blutzuckerwerte zu jedem Messzeitpunkt signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als der Basiswert. Sie unterscheiden sich nur zwischen Zeitpunkt 4. Wo + 8. Wo Vit E mit  $p < 0,05$  sowie zwischen 4. Wo Vit EC + 16. Wo Vit E mit  $p < 0,001$  voneinander. Insgesamt scheint ein Trend zu kleineren Werten vorzuliegen.

Bei Patient 2 unterscheiden sich die Zeitpunkte 8. Wo Vit E mit  $p < 0,05$  sowie 4. Wo, 8. Wo und 12. Wo Vit E2 mit  $p < 0,001$  signifikant vom Basiswert. Diese lagen höher. Zwischen den einzelnen Messwerten unterscheiden sich die Bz-Werte nur zwischen 12. Wo und 16. Wo Vit E mit  $p < 0,05$ , 16. Wo Vit EC und Kontrolle 1 mit  $p < 0,001$  sowie zwischen Kontrolle 2 und 4. Wo Vit E2 mit  $p < 0,05$  signifikant voneinander. Es liegt kein Trend in eine Richtung vor.

Auch die korrespondierenden  $HbA_{1c}$ -Werte der entsprechenden Untersuchung sind aufgeführt. Diese korrelieren nicht mit den durchschnittlichen Bz-Werten.

Die Bz-Werte von Proband 1 liegen unter denen von Proband 2. Die  $HbA_{1c}$ -Werte beider Probanden verhalten sich zu den Bz-Werten invers.

Zeit	Proband 1		Proband 2	
	Bz	$HbA_{1c}$	Bz	$HbA_{1c}$
<b>Basis</b>	138 ± 16	10,8	149 ± 48	7,4
<b>4.WoE</b>	114 ± 17	9,5	165 ± 62	7
<b>8.WoE</b>	110 ± 16	9,1	172 ± 57	7,1
<b>12.WoE</b>	120 ± 18	9,7	167 ± 42	6,4
<b>16.WoE</b>	117 ± 23	9,3	139 ± 39	6,4
<b>4.WoEC</b>	102 ± 23	8,7	146 ± 44	6,7
<b>8.WoEC</b>	94 ± 21	8,7	162 ± 43	6,3
<b>12.WoEC</b>	93 ± 17	8,5	153 ± 52	6,2
<b>16.WoEC</b>			147 ± 52	6,5
<b>Kontr.1</b>	100 ± 15	8,5	174 ± 49	6,5
<b>Kontr.2</b>	90 ± 16	7,3	171 ± 46	7,1

Tab. 7 zeigt die Bz-Werte und die Standardabweichung der Eigenmessungen aus venösem Blut von zwei Probanden im Verlauf der Studie. Die Werte sind in mg/dl angegeben. Zusätzlich sind die korrespondierenden  $HbA_{1c}$ -Werte in % angegeben.

#### 4.4.7. Die MDA-Konzentration der Einzelmesswerte der Gruppe B

Da die Überprüfung der einzelnen Zeitpunkte auf Normalverteilung nur teilweise positiv verlief, konnten die statistischen Verfahren nicht festgelegt werden.

Die einzelnen Messwerte zeigen gegenüber dem Basiswert keinen einheitlichen Verlauf.

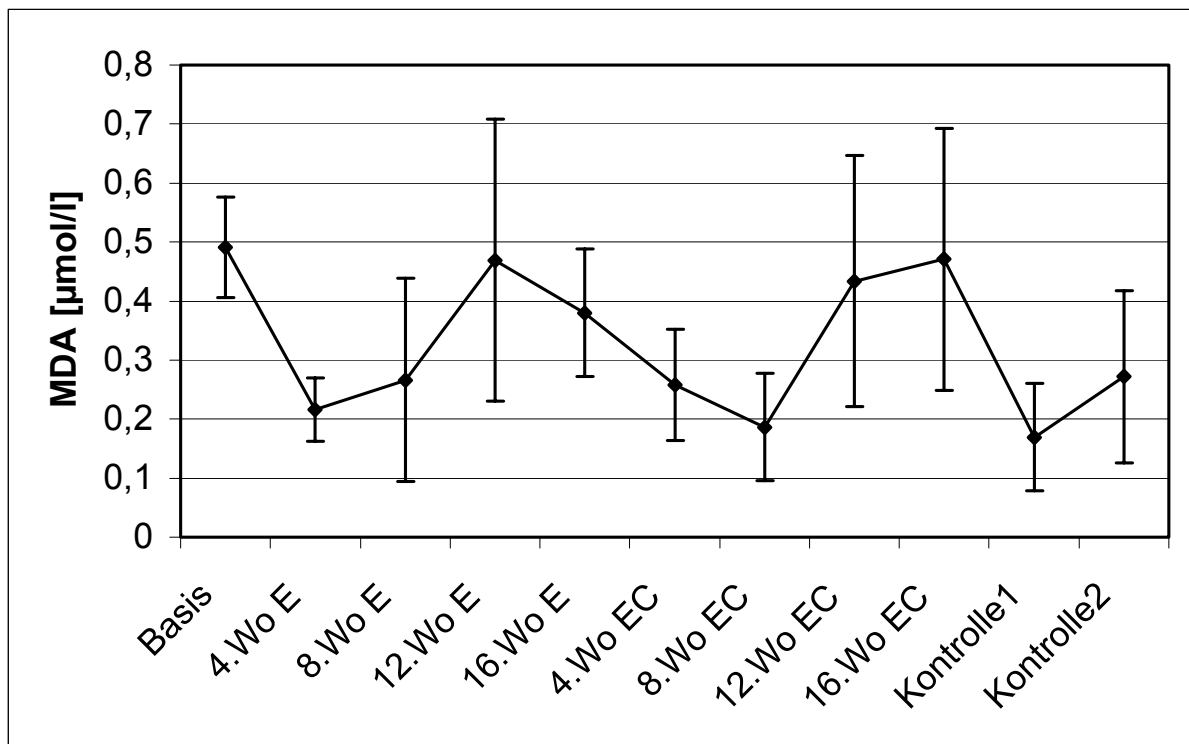


Abb. 44 zeigt die durchschnittlichen Plasma-MDA-Werte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der MDA-Werte an.

#### 4.4.8. Die gemittelten MDA-Konzentrationen der Gruppe B

Da die Überprüfung der einzelnen Zeitpunkte auf Normalverteilung nur teilweise positiv verlief, musste ebenfalls auf eine weitere Auswertung verzichtet werden, da die statistischen Auswertungsverfahren nicht festgelegt werden konnten.

Besonders die große Standardabweichung als auch der sehr große Standardfehler würden eine statistische Signifikanz zusätzlich verhindern.

Die Höhe des MDA-Gehaltes scheint im Verlauf der Studie unter Vitamin-Gabe zu sinken. Einen weiteren Abfall zeigt der Zeitpunkt Kontrolle ohne Vitamin-Supplementierung.

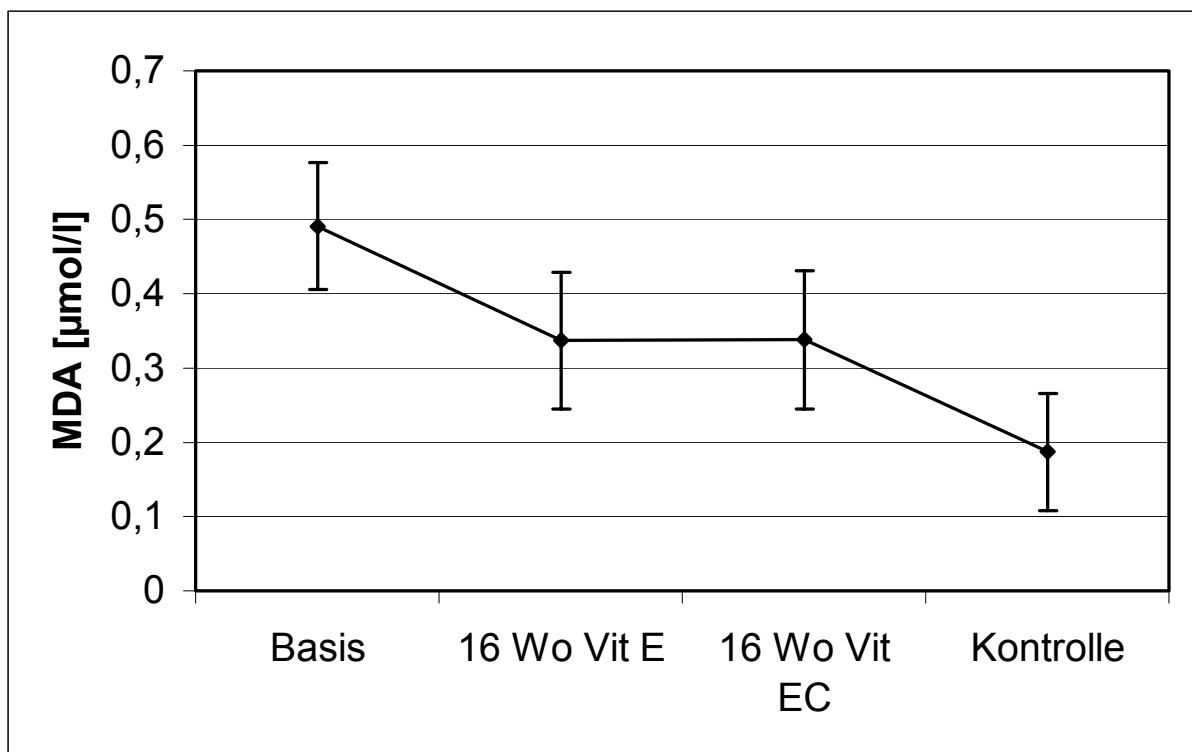


Abb. 45 zeigt die gemittelten Plasma-MDA-Werte von Gruppe B (n=8) im Verlauf der Studie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der MDA-Werte an.



## **5. Diskussion**

### **5.1. Statistische Probleme**

Bevor die Ergebnisse dieser Studie diskutiert werden, sollen die Probleme bei der statistischen Auswertung näher betrachtet werden. In der vorliegenden Studie ist der Nachweis der statistischen Signifikanz aufgrund der geringen Anzahl an Patienten schwer zu führen. Für die Studiengruppe A ist es aus diesem Grund nicht möglich, auf Normalverteilung zu testen. Da jedoch dieses Ergebnis die Auswahl der weiteren Testverfahren bestimmt, muss in dieser Gruppe von den Gruppen B und C interpoliert werden. Nur wenige Messwerte waren in diesen Gruppen nicht normal verteilt, so dass sie auch für die Werte der Gruppe A angenommen wird.

Als zweites Problem zeigt sich die große interindividuelle Streubreite einzelner Parameter. Vor allem bei der Albuminausscheidung ist die Varianz sehr ausgeprägt. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine große Standardabweichung, welche einen statistisch signifikanten Nachweis verhindern bzw. maskieren kann. Aufgrund der hohen Standardabweichungen, die bei der Albuminausscheidung größer als der Mittelwert sind, wird der Standardfehler berechnet und verwendet. Diese Vorgehensweise wird nach Rücksprache mit der Abteilung Anwendung und Dokumentation im Hochschulrechenzentrum an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Es war aus logistischen Gründen nicht möglich, mehr als 12 Probanden in die Studie zu involvieren. Zusätzlich konnten vier Diabetiker die Studie nicht komplett beenden. Von 8 Probanden wurden vier ausgewählt, bei denen zusätzlich die Hb-AGE gemessen wurden und eine zweite Phase mit Vitamin-E-Gabe angeschlossen wurde.

## 5.2. Vorzeitige Studienabbrüche

Im Verlauf der Studie mussten zwei Patienten die Studie aufgrund einer Vitamin-C-Unverträglichkeit abbrechen. Bei der Unverträglichkeit handelte es sich in beiden Fällen um leichte Magenschmerzen, die sofort nach dem Absetzen verschwanden.

Ein Patient musste die Studie aufgrund eines Apoplex vorzeitig beenden. Das dieser Fall kausal mit der Tokopherolgabe zusammenhängt, ist sehr unwahrscheinlich, da der Patient schon seit sehr vielen Jahren unter einem schlecht eingestellten Diabetes mellitus sowie Bluthochdruck litt.

Der letzte Abbruch ergab sich aus der ärztlichen Empfehlung, Vitamin C einzunehmen. Bis dahin war nur die erste Hälfte der Phase mit Vitamin-E-Supplementierung um.

## 5.3. Grundlage der Studie

Trotz aller medizinischen Fortschritte in der Therapie des Diabetes mellitus ist die Lebenserwartung der Diabetiker gegenüber den nichterkrankten Mitmenschen erniedrigt. Mittlerweile sind dabei kaum noch akute Komplikationen zu erwarten. Stattdessen erkranken die Diabetiker an einer Vielzahl von Folgeerkrankungen, wie Mikro- und Makroangiopathie, die wiederum für die Kostenträger einen hohen finanziellen Aufwand bedeuten. Dabei sind etwa 90% der Behandlungskosten des Diabetes mellitus für die Behandlung der Folgeschäden aufzubringen (Rösen et al., 1991; Rösen, 1994; Parving, 1998).

Das wichtigste Ziel zur Vermeidung von Folgeschäden ist ein möglichst niedriger HbA<sub>1c</sub>-Wert als Parameter des Glukosestoffwechsels. Damit ist neben der Verbesserung der Lebensqualität auch eine Senkung der Behandlungskosten verbunden. Die Ergebnisse der DCCT-Studie zeigen diesen Einfluss sehr eindrucksvoll. Schon die Senkung des HbA<sub>1c</sub>-Wertes um 2 % senkt das Risiko für Folgeerkrankungen um bis zu 76% (Ohne Autor, 1993). Deshalb wird nach wie vor nach neuen Therapieoptionen geforscht und Bewährtes, wie die in der DCCT-Studie verwendete intensivisierte Insulintherapie, forciert.

Mittlerweile deuten eine Vielzahl von Studien auch auf einen Einfluss radikalischer Prozesse hin. Daher könnte die antioxidative Therapie ein elegantes Instrument zur Vermeidung von Folgeerkrankungen sein.

Die vorliegende Studie soll den Einfluss der antioxidativen Vitamine E und C auf die diabetischen Folgeschäden untersuchen. Die Kombination der beiden Vitamine bietet sich aus mehreren Gründen an. Es ist bekannt, dass das lipophile Antioxidans Vitamin E und hydrophile Antioxidans Vitamin C synergistisch wirken. Dadurch ist eine verbesserte Wirkung durch die Kombination zu erwarten. Außerdem ist diese Therapie sowohl für den Diabetiker als auch für die Krankenkassen sehr preiswert. Aufgrund des Status der Vitamine als Lebensmittel selbst in hoher Dosierung sind Tageskosten von weniger als 50 Cent möglich.

Zur Quantifizierung der Folgeschäden wird die diabetische Nephropathie gewählt. Die Beurteilung des Schweregrades ist über die Messung der Albuminausscheidung leicht möglich. Zusätzlich ist es eine minimal invasive Methode, die aufgrund des einfachen Procedere und der vorhandenen Erfahrung der Patienten mit der Sammlung besonders geeignet ist.

Viele Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Radikalen und diabetischen Folgeschäden. Der kausale Zusammenhang ist allerdings bisher nicht eindeutig geklärt. Ebenfalls offen ist die Frage, ob aus den diabetischen Stoffwechselveränderungen ein erhöhter oxidativer Stress resultiert oder der erhöhte oxidative Stress für diabetische Veränderungen verantwortlich ist. Diese Diskussion findet vor allem deshalb statt, weil noch keine verlässlichen Methoden für den direkten Nachweis radikalischer Prozesse vorliegen (Ceriello et. al, 1997). Vor allem die hohe Reaktivität und damit äußerst geringe Lebensdauer machen einen direkten Nachweis schwer. Außerdem ist der Ort ihrer Entstehung nicht leicht zu erreichen.

Deshalb werden indirekte Parameter zur Beurteilung des oxidativen Status eingesetzt. Zu diesen zählen beispielsweise die Bestimmung des oxidierten LDL, MDA oder konjugierter Lipiddiene (Rösen, 1994; Sun et al., 1999).

In dieser Studie fiel die Entscheidung auf das MDA, da dieser Parameter relativ einfach zu bestimmen ist. Ein Problem stellte dabei die vorgegebene Logistik dar. Es war aus

organisatorischen und personellen Gründen nicht möglich, die Blutproben sofort zu bearbeiten und einzufrieren. Das scheint der Grund dafür zu sein, dass die Ergebnisse der MDA-Bestimmung so inkonklusiv sind.

Dass das MDA im Gegensatz zu anderen Parametern für diese Studien geeignet ist, zeigen folgende Arbeiten. Die Arbeitsgruppe Nourooz-Zadeh findet bei Diabetikern einen deutlich erhöhten Plasmaspiegel an Lipidhydroperoxiden. Das deutet auf eine erhöhte Radikalkonzentration hin (Nourooz-Zadeh et al., 1995). Weniger eindeutig fiel hingegen die Studie von Mekinova und Mitarbeitern aus. Sie verabreichten nichtbehandelten diabetischen Ratten die antioxidativen Vitamine C, E und  $\beta$ -Karotin. Durch die Gabe der antioxidativen Vitamine konnten einige Parameter des oxidativen Stresses gesenkt werden (z. B.: MDA und Glutathionperoxidase), während andere sich nicht veränderten bzw. sogar anstiegen (Katalase bzw. SOD). Trotzdem bewerten die Autoren den Einfluss der Vitamine als positiv (Mekinova et al., 1995).

Als Quelle der Radikalen wird der gesamte Prozess der nichtenzymatischen Glykosylierung von der Glukose über die Schiff'sche Base bis zu den AGE angesehen (Jain, 1989; Tada et al., 1997; Wolff et al., 1987; Rösen et al., 1991; Makita et al., 1992).

Die genannten Reaktionen können zu einer vermehrten Glykosylierung und weiteren Veränderungen an Proteinstrukturen führen, die für die Entwicklung der diabetischen Folgeschäden mitverantwortlich gemacht werden. Es lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Stoffwechsellage und dem Auftreten von Folgeschäden erkennen, der um so deutlicher wird, je länger der Parameter den durchschnittlichen Blutzuckerspiegel repräsentiert (Ceriello, 1997; Sell et al., 1992).

Mittlerweile ist bekannt, dass durch die Produkte der nichtenzymatischen Glykosylierung auch Schäden auf zellulärer Ebene entstehen. So korreliert die Höhe der Serum-AGE-Spiegel statistisch signifikant positiv mit der Basalmembrandicke. Dabei zeigte sich auch, dass die Menge an advanced glycosylated endproducts als eine unabhängige Variable anzusehen ist (Berg et al., 1997). Weiterhin bewirken AGE-Produkte eine erhöhte Bildung von cross-links auf dem Typ-IV-Kollagen der Basalmembran, welches wiederum einen Einfluss auf die Ausbildung anderer Basalmembrankomponenten (Laminin, Heparansulfat, Proteoglykan)

zeigt. Zusätzlich soll der normale Aufbau der Membranporen behindert werden (Brownlee et al., 1988).

Aus diesem Grunde wurden in dieser Studie drei Parameter der nichtenzymatischen Glykosylierung gemessen und zwar sowohl das Fruktosamin als auch das HbA<sub>1c</sub> und für einige Patienten auch die Hb-AGE als langfristigster Parameter.

Wenn radikalische Reaktionen zu einer erhöhten nichtenzymatischen Glykosylierung führen, dann kann der Einsatz von Antioxidantien zur Verminderung der nichtenzymatischen Glykosylierungsprodukte und damit zu einer Verbesserung der diabetischen Nephropathie führen.

Es müssen auch weitere beeinflussende Faktoren berücksichtigt werden, da die diabetische Nephropathie eine multifaktorielle Pathogenese aufweist.

#### **5.4. Andere Einflussfaktoren auf die diabetische Nephropathie**

Neben der Stoffwechseleinstellung spielen Faktoren wie die Höhe des Blutdruckes, die Proteinzufuhr oder die körperliche Belastung eine Rolle. Die vorliegende Studie sollte den möglichen Einfluss antioxidativer Vitamine auf die diabetische Nephropathie unter klinischen Bedingungen untersuchen, da die bisherigen Daten entweder unter Laborbedingungen entstanden sind oder nur einen kurzen Untersuchungszeitraum hatten.

Es war aus logistischen Gründen nicht möglich, alle Faktoren zu berücksichtigen. Dazu zählen die körperliche Betätigung, die Ernährungsgewohnheiten und auch die Selbstkontrolle des Blutzuckers.

Gerade bei diesen Parametern war keine Änderung im Verlauf der Studie zu erwarten, da die Teilnehmer schon seit vielen Jahren erkrankt waren und als austherapiert galten.

#### **5.4.1. Der Einfluss der sportlichen Aktivität**

Verstärkte körperliche Aktivität erhöht die Albuminausscheidung im Urin. Die Arbeitsgruppe Hidaka untersuchte, welche endogenen Proteine (Albumin, IgG, IgG4 und  $\beta$ -2-Mikroglobulin) durch körperliche Aktivität, in dieser Studie mit Laufbandtraining standardisiert, vermehrt ausgeschieden werden. Als Kontrollgruppe wurden normalgewichtige Nichtdiabetiker genommen. Es zeigte sich, dass in der Gruppe der Typ-2-Diabetiker die Ausscheidung an Albumin, IgG4 und  $\beta$ -2-Mikroglobulin durch die Aktivität erhöht ist. (Hidaka et al., 1998).

Dieser Einfluss ist in dieser Arbeit direkt nach dem Sport gemessen worden. Daten zu regelmäßiger Aktivität liegen nicht vor. Theoretisch wäre anzunehmen, dass Sport während der Sammlung zu einer erhöhten Ausscheidung an Albumin führt. Es gibt allerdings ebenfalls keine Daten darüber, in welcher Größenordnung dieser Einfluss bestehen würde.

Der Einfluss des Faktors in dieser Studie wurde und konnte nicht berücksichtigt werden, da er nicht zu quantifizieren und das Teilnehmerkollektiv nach Aktenlage nicht sportlich aktiv war.

#### **5.4.2. Der Einfluss der Proteinzufuhr**

Einige Untersuchungen zeigen einen positiven Effekt einer Proteinzufuhreinschränkung auf die Funktion der diabetischen Niere. Rattenversuche zeigen, dass die Albuminausscheidung sich signifikant erhöht, wenn die Proteinzufuhr statt 8% auf 24% der täglichen Energiezufuhr erhöht wird (Copeland et al., 1989).

Beim Menschen zeigt sich bei einer Senkung der Proteinzufuhr von 1,0 g/kg KG auf 0,6 g/kg KG nach 4 Wochen eine Verminderung der Albuminausscheidung um 29%. Wird jedoch die Proteinzufuhr wieder auf den Ausgangswert gesteigert, steigt die Albuminausscheidung erneut um 25% an (Hansen et al., 1999).

Grundsätzlich muss dabei zwischen Typ-1- und Typ-2-Diabetikern unterschieden werden. Bisher liegen bei Typ-1-Diabetikern nur widersprüchliche Langzeitdaten vor. Zeller et al.

konnten bei Diabetikern mit einer Zufuhr von 0,6 g Protein /kg KG eine deutlich verlangsamte Nierenfunktionsabnahme gegenüber der Gruppe mit einer Zufuhr von 1 g / kg KG feststellen (Zeller et al., 1999). Dieser Effekt wird allerdings in einer Studie der Arbeitsgruppe Hansen nicht bestätigt. Sie hatten zusätzlich mit dem Problem zu kämpfen, dass die Diabetiker in der Gruppe der restriktiven Proteinzufuhr trotz intensiver Bemühungen das Ziel nicht erreichten. Ihre durchschnittliche Zufuhr lag bei 0,9 g/kg KG (Hansen et al., 2002). Allerdings lag die Nierenfunktionsabnahme auf dem Niveau der Gruppe mit niedriger Proteinzufuhr bei der zuvor genannten Zellerstudie. Dieser Unterschied wird von der Arbeitsgruppe Hansen vor allem auf den Einsatz von ACE-Hemmern und AT1-Blockern zur Blutdrucksenkung zurückgeführt.

Bei Typ-2-Diabetikern konnte bis heute kein positiver Einfluss einer Proteinrestriktion auf die Albuminurie gefunden werden (Pijls et al., 1999).

In dieser Studie wurde daher auf eine Auswertung der Proteinzufuhr verzichtet, da die Datenlage bisher keinen eindeutigen und vor allem keinen langfristigen Vorteil einer Proteinrestriktion auf die diabetische Nephropathie erkennen lässt. Zusätzlich hätte das Risiko einer Beeinflussung der Ernährungsgewohnheiten der Diabetiker bestanden, da sie sich aktiv mit Ihrer Ernährung auseinander gesetzt hätten. Armstrong et al. zeigen sehr deutlich, wie stark dieser Einfluss sein kann. In ihrer Untersuchung fiel durch eine Ernährungsberatung der durchschnittliche Nüchternblutzucker um fast 30% und dadurch natürlich auch der HbA<sub>1c</sub>-Wert signifikant von 7,44% auf 5,91% ( $p < 0,01$ ) (Armstrong et al., 1996).

Es wurde allerdings darauf geachtet, dass es während der Studie zu keiner Umstellung der medikamentösen Therapie kam, um diesen Einflussfaktor zu eliminieren.

#### **5.4.3. Der Einfluss des Blutdruckes**

Der Blutdruck ist ein zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung der diabetischen Nephropathie. Den Einfluss eines erhöhten Blutdruckes auf diabetische makro- und mikrovaskuläre Komplikationen untersuchte die UKPDS-Studie über den Verlauf von 9 Jahren. In dieser Studie wurden 1.148 Probanden in eine eng kontrollierte

(RR < 150/85 mmHg) und eine nicht so eng kontrollierte (RR < 180/105 mmHg) Gruppe unterteilt. Der durchschnittliche Blutdruck lag zu Beginn der Studie bei 160/94 mmHg. Bei der eng kontrollierten Gruppe sank dieser auf 144/82 mmHg und war damit signifikant niedriger als bei der nicht so eng kontrollierten Gruppe mit 154/87 mmHg.

Das Risiko an mikrovaskulären Schäden zu erkranken, sank dabei in der intensiv behandelten Gruppe signifikant um 37%. Das Risiko einer Albuminausscheidung über 50 mg/24 h war unter enger RR-Kontrolle ebenfalls niedriger. Ebenso sank das Risiko, eine Albuminausscheidung über 300 mg/l zu bekommen. Nach 9 Jahren steigt das Risiko einer Albuminurie um 9% in der eng kontrollierten Gruppe an (Turner et al., 1998).

Die Arbeitsgruppe von Bakris berichtet von einem positiven Einfluss einer Blutdrucksenkung auf die Proteinurie, die mit einer Kombinationstherapie aus ACE-Hemmer plus Kalziumantagonisten um 62% gesenkt wurde. In dieser Studie wurde der Blutdruck auf unter 140/90 mmHg gesenkt (Bakris et al., 1998). Weir et al. fordern eine Blutdrucksenkung auf 125/75 mmHg (Weir et al., 1998).

Damit liegen ausreichend Daten vor, die den positiven Einfluss einer Blutdrucksenkung auf die diabetischen Folgeschäden zeigen. In allen Studien lagen die Blutdruckwerte, die den positiven Effekt bewirkten um die 140/85 mmHg. In der vorliegenden Studie liegen die gemessenen Werte während der gesamten Studiendauer auf diesem Niveau. Nur zu wenigen Zeitpunkten unterscheiden sich die Werte signifikant vom Basiswert. Allerdings liegen weder Daten vor, die den Einfluss einer noch stärkeren Blutdrucksenkung untersucht hätten, noch liegen Daten vor, die den Einfluss einer weiteren Senkung im Verlauf weniger Wochen untersucht hätten.

In der vorliegenden Studie wurde deshalb keine weiterführende Auswertung des Einflusses auf die Albuminausscheidung durchgeführt. Fraglich bleibt zusätzlich, ob ein langfristiger Nutzen einer Blutdrucksenkung zu erwarten ist. Die UKPS jedenfalls zeigte einen Vorteil nur für den Zeitraum von 5 Jahren (Turner et al., 1998).

Auch ein Vergleich zwischen dem Verlauf der Blutdruckwerte mit denen der Albuminausscheidung gibt keinen Hinweis auf einen möglichen Einfluss.



#### 5.4.4. Der Einfluss der Blutglukose

Es ist bekannt, dass dem Glukosestoffwechsel eine große Bedeutung in bezug auf das Auftreten der Folgeschäden zukommt.

In der vorliegenden Studie haben nur 2 Probanden eine Blutzuckerprotokollierung durchgeführt. Aus diesem Grund liegen keine kompletten Ergebnisse für diesen Parameter vor.

Bei Patient 1 sind die durchschnittlichen Blutzuckerwerte zu jedem Messzeitpunkt signifikant niedriger als der Basiswert. Die Zeitpunkte 4. Wo + 8. Wo Vit E und die Zeitpunkte 4. Wo Vit EC + 16. Wo Vit E unterscheiden sich signifikant voneinander. Insgesamt scheint ein Trend zu geringeren Messwerten vorzuliegen.

Bei Patient 2 liegen die Messzeitpunkte 8. Wo Vit E, 4. Wo VitE2, 8. Wo VitE2 und 12. Wo Vit E2 signifikant über dem Basiswert. Zwischen den einzelnen Messzeitpunkten unterscheiden sich die Werte 12. Wo Vit E und 16. Wo Vit E, 16. Wo Vit EC und Kontrolle 1 sowie Kontrolle 2 und 4. Wo Vit E2 signifikant voneinander. Bei Patient 2 ist kein Trend im Verlauf der Werte zu erkennen. Vielmehr scheinen sie eine wellenförmige Schwankungsbreite zu haben.

Insgesamt ist damit bei diesem Parameter kein einheitliches Ergebnis zu sehen. Ob bei Patient 1 ein positiver Einfluss der Supplementierung vorliegt, kann nicht abschließend geklärt werden. Es liegen jedoch Daten vor, die diese Hypothese stützen würden. In einer Studie von Bierenbaum et al. wurde diabetischen Patienten über einen Zeitraum von zwei Wochen Vitamin E in einer Menge von 2.000 IE gegeben. Der durchschnittliche Blutzuckerspiegel der Patienten sank signifikant von 214 mg/dl auf 173 mg/dl. Danach wurde die Zeit auf sechs Versuchswochen mit einer Vitamin-E-Gabe von 2.000 IE pro Tag ausgeweitet und anschließend durch eine sechswöchige Placebokontrollphase abgeschlossen. Der durchschnittliche Blutzuckerspiegel sank dabei statistisch signifikant von 193 mg/dl zu Beginn der Studie auf 181 mg/dl nach 6 Wochen Vitamin-E-Gabe und stieg nach 6 Wochen Placebophase auf 195 mg/dl an (Bierenbaum et al., 1985).

Auch die Gabe von 900 mg Tokopherol über 3 Monate in einer doppelblind-placebokontrollierten-crossover-Studie an 25 Typ-2-Diabetikern zeigte eine Senkung des

Blutzuckerspiegels von anfänglich 8,3 mmol auf 7,5 mmol. Ebenso sank der Anteil des HbA<sub>1c</sub> von 7,8% auf 7,1% (Paolisso et al., 1993).

Andere Studien können diesen Effekt nicht nachweisen. In einer Studie von Ceriello und Mitarbeitern blieb der durchschnittliche Blutzuckerspiegel während einer Dauer von 2 Monaten bei den Probanden unverändert (Ceriello et al., 1991).

In der vorliegenden Studie liegt die Vitamin-E-Menge mit 1.200 IE unter der Bierenbaum et al Dosierung, dafür aber im Rahmen der Untersuchung der Arbeitsgruppe Paolisso. Da jedoch ohne Supplementierung bei Patient 1 ein Anstieg des Bz-Wertes ausblieb und die Datenlage insgesamt widersprüchlich ist, ist eher davon auszugehen, dass kein Effekt vorliegt.

Eine Bz-Messung sollte für die vorliegende Studie nicht eingeführt werden, weil die anderen Teilnehmer nicht daran gewöhnt waren. Das Risiko, einen Einfluss auf das Verhalten der Teilnehmer auszuüben, und dadurch falsche Ergebnisse zu bekommen, erschien größer als ein möglicher Vorteil für die Aussagekraft des Parameters. Schließlich wurden noch validere Daten über die Bestimmung der Langzeitparameter gewonnen.

### **5.5. Vergleich des Blutglukosespiegels mit der Höhe des HbA<sub>1c</sub>-Wertes**

Die Höhe des Blutzuckerspiegels wirkt sich direkt auf den HbA<sub>1c</sub>-Wert aus. Es gibt weder eine statistische Möglichkeit einer Auswertung bei einer Einzelperson noch bei 2 Personen. Deshalb muss diese rein quantitativ erfolgen. Sie kann jedoch erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss der antioxidativen Vitamine geben.

Die Betrachtung der Werte beider Patienten ergibt einen konträren Verlauf zwischen der Höhe des Bz-Spiegels und des HbA<sub>1c</sub>-Wertes. Patient 1 besitzt bei relativ niedrigen Blutzuckerwerten relativ hohe HbA<sub>1c</sub>-Werte, während bei Patient 2 genau das Gegenteil zu sehen ist.

Zusätzlich lässt sich auch kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des durchschnittlichen Blutglukosespiegels und der Höhe des HbA<sub>1c</sub>-Wertes erkennen. Zusätzlich werden bei nahezu identischen Bz-Spiegeln unterschiedliche HbA<sub>1c</sub>-Werte bestimmt. Bei Patient 1 entspricht der durchschnittliche Wert von 100 mg/dl bzw. 99 mg/dl einem HbA<sub>1c</sub>-

Wert von 8,5% bzw. 7,9%. Noch deutlicher sind diese Unterschiede bei Patient Nummer 2. So entspricht ein durchschnittlicher Blutglukosegehalt von 174 mg/dl einem HbA<sub>1c</sub>-Wert von 6,5% und 171 mg/dl Glukosespiegel entsprechen 7,1%.

Diese großen Unterschiede können sowohl durch den nur punktuellen Status des Messzeitpunktes als auch durch die unterschiedliche Genauigkeit verschiedener Messgeräte erklärt werden. Natürlich liegt in der Eigenmessung eine zusätzliche Fehlerquelle.

Dadurch hätte sich, auch wenn alle Patienten Ihre Blutzuckerwerte bestimmt hätten, eine große, schwer quantifizierbare Fehlerquelle ergeben. Insgesamt wird eine Ungenauigkeit von  $\pm 15\%$  vom eigentlichen Wert zugestanden. Zusätzlich zeigen Messgeräte meist keine lineare Abweichung über den gesamten Messbereich, sondern es sind scherenförmige Abweichungen möglich. Dadurch wäre die Messungenauigkeit im Normalbereich geringer als im hohen Messbereich. Theoretisch könnten niedrige Messwerte mit einer Ungenauigkeit von  $-15\%$  gemessen werden und hohe Werte mit  $+15\%$ .

Hilfreich für weitere Studien wäre die Verwendung gleicher Messgeräte, einer Schulung der Patienten für deren Handhabung und eine Festlegung der Anzahl an Messpunkten und Messzeiten. Ebenfalls sollte vor der Verwendung der Geräte eine Vergleichskurve zu einer Standardmethode erfolgen, damit eine Aussage über die Größenordnung der Fehlerquelle möglich wird.

## **5.6. Einfluss der antioxidativen Vitamine auf Parameter der nichtenzymatischen Glykosylierung**

Für die Quantifizierung der nicht enzymatischen Glykosylierung können verschiedene Parameter herangezogen werden, die einen unterschiedlich langen Zeitraum der retrospektiven Blutzuckerkontrolle ermöglichen.

Der Mechanismus der nichtenzymatischen Glykosylierung von Proteinen lässt sich vereinfacht wie folgt darstellen. Die Glukose reagiert mit freien Gruppen der in den Proteinen vorhandenen Aminosäuren zur labilen Schiff'schen Base. Im weiteren Zeitverlauf können daraus über vielfältige chemische Reaktionen, den sogenannten Amadori-Umlagerungen,

letztendlich die advanced glycosylated endproducts entstehen. Erst diese Produkte stellen irreversible Strukturen da. Alle anderen Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen mit unterschiedlichen Gleichgewichtskonstanten. Daraus ergibt sich, dass sich bei steigendem Blutglukosegehalt die Konzentration der verschiedenen Produkte in unterschiedlicher Zeit erhöht.

Die körpereigenen Proteine unterliegen einem natürlichen Ana- und Katabolismus. Daher steigen auch die Konzentrationen der AGE nicht stetig an, sondern spiegeln die durchschnittliche Höhe des Blutglukosespiegels über den retrospektiven Zeitraum der Proteinhalbwertszeiten wieder.

In der vorliegenden Studie war es möglich, die durchschnittlichen Blutglukosespiegel durch drei Parameter zu erfassen. Sowohl der kurzzeitige Parameter Fruktosamin (etwa 2 Wochen) als auch der längerfristige Parameter des HbA<sub>1c</sub> (etwa 3 Monate) werden routinemäßig untersucht. Zusätzlich war es möglich einen Ultra-Langzeitparameter, das Hb-AGE, in den USA bestimmen zu lassen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit einer weitaus differenzierteren Betrachtung. Leider war es bei der Bestimmung der Hb-AGE nicht möglich, diese für alle Patienten und Messzeitpunkte zu bestimmen. Insgesamt wurden bei 4 Patienten Bestimmungen durchgeführt.

Die Datenlage der in dieser Studie eingesetzten antioxidativen Therapie mit Vitamin E und C auf den Prozess der nicht enzymatischen Glykosylierung ist sehr ermutigend. Ebenso interessant erscheinen die Arbeiten, die Zusammenhänge zwischen Produkten der nichtenzymatischen Glykosylierung und der Bildung von Radikalen aufzeigen.

Tada et al. zeigen, dass eine Glukoseinkubation von Mesangialzellen zur erhöhten Bildung von Lipidperoxiden führen (Tada et al. 1997).

Weiterhin können reduzierende Zucker, wie die Blutglukose als Katalysatoren oxidativer Modifikationen und der Bildung von cross-links dienen (Baynes, 1991; Wolff et al., 1987).

Damit ist die theoretische Grundlage des Einflusses von Radikalen auf die nichtenzymatische Glykosylierung und dem möglichen positiven Einfluss der Antioxidantien gegeben.

### 5.6.1. Einfluss auf das Fruktosamin

In einer Studie von Stolba und Mitarbeitern wird über einen positiven Einfluss von Vitamin C auf die Höhe des glykosylierten Albumins berichtet. In der Versuchsanordnung wird Albumin mit Glukose (25 mmol/l) oder mit Glukose und Vitamin C (1 mmol/l) inkubiert. Bei Zusatz von Vitamin C sinkt der Fruktosaminspiegel im Vergleich zur reinen Glukosegruppe um etwa 20% (Stolba et al., 1987). Dies ist schon ein sehr früher Hinweis auf eine mögliche Protektion von antioxidativen Vitaminen auf die Glykosylierung von Proteinen.

Unterstützt werden diese Ergebnisse von Davie et. al., der unter dem Einfluss von Vitamin C (1 g pro Tag über drei Monate) bei Nichtdiabetikern einen Abfall des glykierten Albumins von 1,6% auf 1% feststellt (Davie et. al, 1992).

In der vorliegenden Studie konnte dieser Effekt nicht verifiziert werden. Die gemittelten Fruktosaminwerte liegen in der Gruppe A im Vergleich zum Basiswert zwischen +9% und +3% höher, in der Gruppe B schwanken sie zwischen +4% und -7%. Bei der Betrachtung der Einzelwerte fällt auf, dass die Messwerte der Gruppe A um einen Mittelwert zu schwanken scheinen. Bei der Auswertung von Gruppe B werden die Werte im Zeitverlauf tendenziell niedriger. Es ist zu keinem Messzeitpunkt ein statistischer Unterschied zum Basiswert nachweisbar. Aus diesen Daten kann daher kein positiver Einfluss der antioxidativen Vitamine auf die Fruktosaminbildung abgeleitet werden.

Auch die Arbeitsgruppe Sinclair konnte unter Vitamin-C-Gabe keinen Einfluss auf das Fruktosamin feststellen (Sinclair et al., 1992).

### 5.6.2. Einfluss auf das HbA<sub>1c</sub>

In der Literatur wird von positiven Einflüssen des Vitamin E auf den Anteil glykosylierten Hämoglobins berichtet. In Rattenversuchen wurde eine 30%ige Reduktion gemessen. Dabei wurde den Ratten 1 g Vitamin E pro kg Körpergewicht i. p. gespritzt, was hochgerechnet 75 g Vitamin E beim Menschen entsprechen würde (Ozden et al., 1989). Bei in-vivo-Studien sank der Anteil des HbA<sub>1c</sub> nach einer dreimonatigen Vitamin-E-Gabe von 900 mg/d von 7,8% auf

7,1% (= -9%) (Paolisso et al., 1993). Den gleichen Effekt fanden Jain und Mitarbeiter, die Typ-1-Diabetikern 100 IE Vitamin E pro Tag über drei Monate gaben. Sie stellten ebenfalls einen Abfall des GHb-Spiegels um 10% (12,8% auf 11,5%) fest (Jain et al., 1996). Kähler et al. berichten von einem 0,2%igen Abfall des HbA<sub>1c</sub> (relativ: -3%) unter der Zufuhr von 1.200 IE Vitamin E pro Tag über einen Zeitraum von drei Monaten. Besonders interessant ist, dass in dieser Studie der Ausgangsspiegel bei nur 6,6% lag (Kähler et al., 1993).

Die interessanteste Studie ist von der Arbeitsgruppe Ceriello veröffentlicht worden. Sie fanden einen dosisabhängigen Abfall des HbA<sub>1c</sub>-Wertes bei gleichbleibendem Blutglukosespiegel. In der Placebogruppe änderte sich der HbA<sub>1c</sub>-Anteil nicht. Unter der Gabe von 600 mg Vitamin E pro Tag jedoch sank der HbA<sub>1c</sub>-Anteil von anfänglich 11,5% auf 8,9% nach zwei Monaten. Die Gabe von 1.200 mg Vitamin E pro Tag führte zu einem Abfall der HbA<sub>1c</sub>-Konzentration von 11,8% auf 7,8%. Dies entspricht einer prozentualen Änderung von 23% bei 600 mg Vitamin E bzw. 34% bei 1.200 mg (Ceriello et al., 1991).

Allerdings kommen nicht alle Studien zum gleichen positiven Ergebnis. In einer Untersuchung von Reaven und Mitarbeitern an 21 Männern mit Typ-2-Diabetes konnte bei einer Gabe von 1.600 IE Vitamin E pro Tag in einer placebokontrollierten Studie kein signifikanter Einfluss auf die Glykosylierung (Hämoglobin, Albumin, Gesamtplasmaproteine, LDL) gefunden werden. Der Anteil des HbA<sub>1c</sub> in dieser Studie lag dabei zwischen 6% und 10% (Reaven et al., 1995).

In der vorliegenden Untersuchung zeigen die antioxidativen Vitamine keinen statistisch zu sichernden Einfluss auf die Höhe des HbA<sub>1c</sub>-Anteils. Eine differenziertere Betrachtung zeigt jedoch interessante Tendenzen.

Die HbA<sub>1c</sub>-Werte liegen bei der Gruppe A unter Vitamin-E-Gabe um 4%, nach Zugabe von Vitamin C um 5%, während der Kontrollphase um 6% und nach der erneuten Vitamin-E-Gabe um 1% unter dem Basiswert. In dieser Gruppe ist daher kaum ein Einfluss der Antioxidantien auf das HbA<sub>1c</sub> anzunehmen. Allerdings ist gerade diese Gruppe sehr inhomogen, was sich an den hohen Standardfehlerbalken ablesen lässt. Trotz des Absetzens der Vitamine sank der HbA<sub>1c</sub>-Wert weiter und stieg nach erneuter Vitamin-E-Gabe sogar an. Dieser Befund ist so nicht erklärbar. Auch die Daten der anderen Studien geben keinen

Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang. Jedoch kann bei einer Gruppengröße von 4 Patienten ein zufälliger Befund nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Gruppe B sanken die HbA<sub>1c</sub>-Werte während unter der Vitamin-E-Supplementierung um 4% und nach Addition von Vitamin C um 10%, ohne statistisch signifikant zu werden. In dieser Gruppe lag der Kontrollwert 9% unterhalb des Basiswertes. Die Werte können sowohl die These eines positiven Einflusses der Antioxidantien auf das HbA<sub>1c</sub> als auch einen synergistischen Effekt beider Vitamine stützen. Die Befunde von Ceriello et al. im zweistelligen Prozentbereich sind nicht erreicht worden. Vielmehr entsprechen sie der Arbeit von Kähler und Mitarbeitern und der Arbeitsgruppe Jain. Nicht vergessen werden darf dabei jedoch, dass die Studien aufgrund ihres unterschiedlichen Patientengutes schwer miteinander zu vergleichen sind. Es scheint jedoch plausibel, dass bei schlecht eingestelltem Diabetes die Möglichkeiten zur Verbesserung größer sind als bei gut eingestellten Patienten.

In einer 90 Tage dauernden Studie an 56 Diabetikern fanden Eriksson und Kohvakka bei der Gabe von 2 g Vitamin C pro Tag, dass der Anteil an HbA<sub>1c</sub> innerhalb der 90 Tage von anfangs 9,3% auf 8,5% sank (Eriksson et al., 1995). Davie et al. untersuchten bei Nichtdiabetikern den Einfluss von 1 g Vitamin C über 3 Monate auf das GHb. Während dieser drei Monate zeigten sich keine nennenswerten Veränderungen des durchschnittlichen Blutglukosespiegels. Der GHb-Anteil bei affinitätschromatographischer Messung zeigte nach 3 Monaten einen Abfall von 6,2% auf 5,1% (Davie et al., 1992).

Auch in neueren Untersuchungen wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. In einer Studie der Arbeitsgruppe Krone wird ebenfalls von sinkenden GHb-Werten nach Gabe von Vitamin C berichtet. In dieser Studie wurde einer Verumgruppe von Ratten Vitamin-C-haltiges Trinkwasser (2,5 g/l) über 2 Monate gereicht. Nach zwei Monaten veränderte sich der GHb-Gehalt der Vitamin-C-supplementierten Gruppe hochsignifikant gegenüber der nichtsupplementierten Gruppe (3,4% gegenüber 4,4%). Jedoch zeigten beide Rattenpopulationen keinerlei Unterschiede in der Höhe des durchschnittlichen Blutglukosegehaltes. (Krone et al., 2001).

Diese Arbeit weist zusätzlich noch auf eine methodische Problematik hin, die auch schon Davie und Mitarbeiter gefunden hatten. Zusammenfassend erklären beide Autoren, dass es bei der Bestimmung von glykosylierten Produkten mit verschiedenen Messmethoden zu

Unterschieden in den Ergebnissen kommen kann. Dabei sind vor allem Methoden, die Molekülladungsunterschiede zur Trennung benutzen, besonders anfällig bei Vitamin-C-Gabe. Da Vitamin C eine strukturelle Ähnlichkeit mit Glukose aufweist, reagiert es genau wie Glukose mit Proteinen. Jedoch kommt es nicht zu weiteren Strukturänderungen. Allerdings ändert sich die Ladung des Moleküls, so dass es bei entsprechenden Bestimmungen zu falschen hohen Werten kommen kann. Nach Aussage der Autoren ist jedoch eine chromatographische Bestimmung, wie sie in dieser Studie mit der Bestimmung durch HPLC verwendet wurde, nicht anfällig (Davie et al., 1992; Krone et al., 2001).

Es liegen damit vielversprechende Ergebnisse für einen positiven Effekt von Vitamin E oder Vitamin C auf die HbA<sub>1c</sub>-Bildung vor.

Bei der Gruppe B sanken die HbA<sub>1c</sub>-Werte unter Vitamin-E-Gabe um 4% und in der Kombinationsgabe um 10%. Die 10% verfehlen das statistische Signifikanzniveau von 5% nur knapp ( $p < 0,08$ ). Das Absetzen der Vitamine führte zu einem Anstieg der HbA<sub>1c</sub>-Werte. Mit diesen Werten könnte ein positiver Einfluss der Vitamine begründet werden. Der nur relativ leichte Anstieg nach dem Absetzen der Vitamine könnte in den aufgefüllten Vitamin-E-Depots begründet sein. Zusätzlich besitzt Vitamin E eine über den Zeitraum der Kontrolle hinweggehende Halbwertszeit, so dass zum Ende der Studie noch über 50% des Vitamin-E-Pools vorhanden war.

Bei diesem Studiendesign kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob die alleinige Gabe von Vitamin E über einen längeren Zeitraum nicht zu einem ähnlichen Ergebnis geführt hätte. In der Literatur sind bisher keine Daten zur kombinierten Vitamingabe zu finden, so dass dieser Befund an dieser Stelle nicht geklärt werden kann. Zur Klärung dieser Frage wäre eine größer angelegte Studie notwendig. Das Design müsste neben der Placebokontrolle und Doppelblindheit noch vier versuchsarme in der Verumgruppe aufweisen. Neben der Placebokontrolle sollte im zweiten Arm die alleinige Vitamin-E-Gabe, im dritten Arm die alleinige Vitamin-C-Gabe und im vierten Arm die Kombinationstherapie getestet werden.

Besonders wichtig scheint in diesem Zusammenhang das Anfangsniveau des HbA<sub>1c</sub>. Es lag bei der Ceriello-et-al.-Studie zu Beginn mit 11,5% relativ hoch, was einer schlechten Bz-Einstellung entspricht. Unter Vitamin-E-Gabe sank der Spiegel um bis zu 34%. Demgegenüber berichtete Kähler nur von einer 3%igen Senkung des HbA<sub>1c</sub>-Wertes. Jedoch



war seine Ausgangsbasis ein  $\text{HbA}_{1c}$  von nur 6,6%. In dieser Untersuchung kann dieser Zusammenhang bestätigt werden. Bei Gruppe A liegt der Ausgangswert bei 7,8% und sinkt unter Vitamingabe um 5%. Bei der Gruppe B ist der Ausgangswert mit 9,2% deutlich höher und sinkt mit 10% deutlich stärker. Die Gruppe B bestand zur Hälfte aus Gruppe A. Daher sind Patienten mit einer schlechten Blutzuckereinstellung dazugekommen und könnten deswegen den Bedingungen der Arbeitsgruppe Ceriello entsprechen. Außerdem ist es bei ihnen damit auch zu einer höheren Senkung des  $\text{HbA}_{1c}$  als 10% gekommen, womit deren Befunde in dieser Studie zumindest tendenziell bestätigt werden können.

### 5.6.3. Einfluss auf die Hb-AGE

Die AGE-Produkte stören den Stoffwechsel der Niere auf vielfältige Weise. So erhöht sich die Bindung von LDL, Albumin und IgG an der Basalmembran. Die Bildung von cross-links auf dem Typ-IV-Kollagen wird erhöht und der Stoffwechsel verschiedener Membranbestandteile wie Laminin und Heparansulfat negativ beeinflusst. Zusätzlich wird sowohl der normale Aufbau der negativ geladenen Proteoglykane und die Ausbildung der Membranporen behindert (Brownlee et al., 1988). Ebenso korreliert die AGE-Höhe mit der Dicke der Basalmembran. Berg und Mitarbeiter zeigten auch, dass die AGE-Werte als unabhängige Variable für das Auftreten der Schäden anzusehen sind (Berg et al., 1997).

Da die AGE-Produkte ebenfalls mit der Schwere von Folgeschäden wie der Retino- oder Nephropathie (Ono et al., 1998) korrelieren, war es besonders interessant, diesen Parameter zu verfolgen. Aufgrund der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. Bucala war es möglich, die Hb-AGE-Werte in den USA bestimmen zu lassen. Die Gruppe A wurde für die Untersuchungen ausgewählt, da die Anzahl der Bestimmungen auf 20 Proben beschränkt war. Bei dieser Gruppe wurden an 5 Zeitpunkten (1 Basiswert, 2 Messungen mit Vitamin-E-Gabe und 2 Monate mit Vitamin-C-Gabe) die AGE-Werte bestimmt.

In der vorliegenden Untersuchung sanken die Hb-AGE-Spiegel gegenüber dem Basiswert nach 2-monatiger Vitamin E Gabe um 15% ( $p < 0,01$ ), nach 4-monatiger Gabe um 10% (n. s.), nach 2-monatiger Kombinationstherapie um 19% ( $p < 0,01$ ) und nach 4-monatiger

Kombinationstherapie um 25% ( $p < 0,01$ ). Wenn die Werte gemittelt werden, so ergibt sich eine 12%ige Senkung des AGE-Spiegels unter Vitamin E und eine 22%ige Senkung unter Vitamin E in Kombination mit Ascorbinsäure. Beide Werte unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) vom Basiswert.

Damit zeigt interessanterweise der Parameter, der den längsten Zeitraum des durchschnittlichen Glukosespiegels widerspiegelt und aufgrund seiner Natur nicht durch kurzfristige Schwankungen zu beeinflussen ist, den deutlichsten Effekt. Obwohl die Probandenanzahl gering ist, sind die Effekte statistisch signifikant. Zusätzlich ist der Einfluss um so höher, je länger die Vitamingabe ist. Hier kann ein synergistischer Effekt beider Vitamine vermutet werden.

Allerdings sind sie dennoch vorsichtig zu interpretieren, da einzelne Ausreißer das Bild verschieben und einen positiven Einfluss der Vitamine vortäuschen könnten. Bei den AGE-Produkten liegen außerdem niedrige Werte vor (3,80 – 5,10 U/mg Hb) – nach Angaben des Picower Institutes damit sogar im Normalbereich ( $< 6,0$  U/mg Hb). Diese Aussage ist mit der Höhe der HbA1c-Werte in dieser Gruppe kongruent. Leider gibt es bisher keine vergleichbaren Daten in der Literatur. Dadurch fällt die Einordnung der Ergebnisse schwer.

In einer neueren Studie berichten Rahbar et al. von neuen Substanzen zur Inhibition von AGE-Produkten. Sie beschreiben dabei auch Erfolge in der bisherigen Forschung mit Aminoguanidin, jedoch keine Arbeiten mit Vitamin E und C (Rahbar et al., 2000).

#### **5.6.4. Einfluss auf die Albuminausscheidung**

Die diabetische Nephropathie besitzt eine multifaktorielle Pathogenese. In der diabetischen Niere sind eine große Anzahl von Stoffwechselprozessen und biologischen Strukturen durch den veränderten Glukosestoffwechsel betroffen. Sie reichen von biochemischen Substratstoffwechselstörungen bis zu Störungen bei der Synthese wichtiger Gewebsstrukturen. Die Schutzmechanismen der antioxidativen Abwehr sind vielfältig, da bei vielen dieser Prozesse auch Radikale eine Rolle spielen.

So wurden in Rattenversuchen durch Vitamin E ein Anstieg von Diazylglyzerol und der Proteinkinase-C-Aktivität, der Fibronektinsynthese sowie der glomerulären Filtrationsrate verhindert. Ebenso wurde die Albuminausscheidung um 73% gesenkt (Koya et al., 1997; Koya et al., 1998; Tada et al., 1997). Die verwendete Tokopherolmenge überstieg mit 40 mg/kg KG die in dieser Studie verwendete Menge (800 mg) um den Faktor 3. Dennoch ist die erzielte Albuminausscheidungssenkung mit 73% beachtenswert. Immerhin liegt die in dieser Studie gemessene Ausscheidungssenkung fast in diesem Rahmen (30% bis 60%).

Ebenso ließ sich bei unbehandelten diabetischen Ratten durch die Gabe von Vitamin E (200 mg/kg KG pro Tag) die im Vergleich zu nichtdiabetischen Ratten um 2,5-fach erhöhte TGF- $\beta$  Konzentration verhindern (Craven et al., 1997). Zusätzlich konnten die renale Hyperfiltration und die Schwere der glomerulären Läsionen korrigiert (Douillet et al., 1996) sowie der Anstieg des glomerulären Volumens verhindert werden (Craven et al., 1997).

Schon aus den genannten Studien geht hervor, dass das Vitamin E auf vielen Ebenen einen positiven Einfluss hat. Jedoch sind die bisher genannten Studien in Tierversuchen ermittelt worden. Zusätzlich sind mit 2,8 g – 14 g (umgerechnet auf eine 70 kg schwere Person) große Tokopherolmengen verwendet worden. Umso interessanter ist der Vergleich mit geringeren Mengen.

Beim Menschen zeigte Vitamin E innerhalb von 3 Monaten ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Proteinurie (-55%) und Albuminurie (-50%) (Kähler et al., 1993).

Die Arbeitsgruppe Kähler verwendete 1.200 IE Tokopherol. Dieselbe Dosierung wurde in der vorliegenden Studie benutzt. Die Größenordnung der Albuminurie lag bei der Arbeit von Kähler et al. niedriger als in dieser Untersuchung.

So zeigt sich bei der Gruppe A unter Vitamin-E-Gabe nach 4 Monaten eine mit 34% nicht ganz so starke Ausscheidungssenkung wie bei Kähler. Auch in der Gruppe B lag der Rückgang der Albuminausscheidung mit 30% ebenfalls deutlich unter den 50% von Kähler et al.. In beiden Fällen konnten die Senkungen keine statistische Signifikanz erreichen, was aber durch den hohen Standardfehler und die geringe Patientenzahl erklärbar ist. Ein Problem, mit dem die Arbeitsgruppe Kähler in Ihrer Untersuchung ebenfalls zu kämpfen hatte. Beispielsweise war die Standardabweichung in der Verumgruppe mit

Tokopherolsubstituierung nach drei Monaten mit 148 mg größer als der Mittelwert von 87 mg. Damit Messwerte mit dieser großen Varianz statistisch gesichert werden können, muss die Fallanzahl weit über zwanzig liegen.

Doch obwohl in allen bisher genannten Studien kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte, lassen sich positive Tendenzen erkennen. Der gemittelte Messwert der Tokopherolsupplementierung (16Wo VitE) in der Gruppe B verfehlte das geforderte Signifikanzniveau mit  $p = 0,08$  knapp. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die hohe interindividuelle Streubreite den Nachweis einer signifikanten Senkung der Albuminausscheidung verhindert, ist die Gruppe C gebildet worden.

Diese besteht aus 10 Patienten. Die zwei Patienten/Innen mit der höchsten Albuminausscheidung wurden ausgeschlossen. Dadurch konnte die Standardabweichung und ebenfalls der Standardfehler erheblich gesenkt werden ( $< 100 \text{ mg/24 h}$ ). In diesem Fall zeigte die Albuminausscheidung bei 4-monatiger Vitamin-E-Gabe ebenfalls einen 30%igen Abfall. Dieser war jedoch mit  $p < 0,05$  statistisch signifikant. Damit ist der Einfluss der hohen interindividuellen Streubreite der Albuminausscheidung auf das Signifikanzniveau verifiziert worden. Zusätzlich wird dadurch die Fragestellung dieser Studie etwas klarer beantwortet. Die Vermutung, dass die antioxidative Therapie einen positiven Einfluss auf die Albuminurie hat, wird erneut unterstützt.

Durch die zweite Phase der Studie sollte geklärt werden, ob eine zusätzliche Gabe von Vitamin C einen synergistischen Effekt auf die Ausscheidung von Albumin hat. Dazu liegen bis heute keine vergleichbaren Studien vor. Deshalb ist es schwer, die hier vorliegenden Ergebnisse vergleichend zu interpretieren.

In Rattenversuchen wurden positive Einflüsse einer Ascorbinsäuregabe auf Parameter der diabetischen Nephropathie gefunden. So konnte z. B. die Proteoglykansynthese stimuliert (McAuliffe et al., 1997) und die Erhöhung des Nierengewichtes verhindert werden. Weiterhin blieb ein Anstieg der TGF- $\beta$ -Konzentration und des glomerulären Volumens sowie ein Anstieg der Albuminclearance aus (Craven et al., 1997). Gerade die Studie von Craven und Mitarbeitern benutzte jedoch hohe Dosen (10 g/kg KG). Für einen 70 kg schweren Menschen

entspräche die Dosierung einer Menge von 700 g. Nicht auszuschließen ist, dass es sich bei der Dosierung um einen Druckfehler handelt.

Die Studien von Stolba et al. in den 80iger Jahren lassen auf einen positiven Einfluss der Ascorbinsäure auf die nichtenzymatische Glykosylierung schließen. Sie konnten durch die Gabe von Vitamin C sowohl den Fruktosaminspiegel senken, als auch die Glykosylierung von verschiedenen Kollagentypen verhindern (Stolba et al., 1987; Stolba et al., 1988). Diese Daten stützen die Hypothese eines positiven Einflusses auf die nichtenzymatische Glykosylierung. Darüber kann zusätzlich die Nephropathie positiv beeinflusst werden.

In dieser Studie zeigt sich unter der kombinierten Therapie über 4 Monate in der Gruppe A ein sehr starker Rückgang der gemittelten Albuminausscheidung von 60%. Trotz dieser sehr deutlichen Reduzierung der Albuminurie konnte keine statistische Signifikanz gesichert werden. Sicherlich spielt erneut der große Standardfehler eine Rolle. Dass es sich bei dieser positiven Tendenz nicht nur um ein Artefakt handelt, wird durch den weiteren Verlauf der Ergebnisse gestützt. Die Senkung der Albuminausscheidung nach 3 Monaten ohne Vitaminsupplementierung liegt bei gerundeten 43%. Dies könnte ein Hinweis auf einen nachlassenden Effekt der Vitamine sein. Dass die Albuminausscheidung noch immer unter dem Basiswert liegt, könnte durch die lange Halbwertszeit der Tokopherole erklärt werden. Die Plasmaspiegel liegen nach 6 Wochen ohne Supplementierung signifikant und nach 12 Wochen nicht signifikant über dem Ausgangswert. Dadurch könnte immer noch ein positiver Effekt erzielt werden. Zusätzlich werden über 32 Wochen gebildete Veränderungen sicherlich nicht in einem Zeitraum von 12 Wochen wieder rückgängig gemacht.

Unter wiederholter Vitamin-E-Zufuhr sinkt die Albuminausscheidung gegenüber den Kontrollwerten. Dieses Ergebnis deutet erneut auf einen positiven Einfluss durch Vitamin-E-Supplementierung hin.

Ein der Gruppe A kongruenter Verlauf der Albuminausscheidung ist in Gruppe B zu finden. Sie sinkt nach der Kombinationsgabe um 49%. Das Absetzen der Vitamine führt zu einem Anstieg der Albuminausscheidung. Sie liegt mit gerundeten 28% unter dem Basiswert und damit deutlich über der Ausscheidung unter Vitaminzufuhr. Dieser Verlauf könnte so erneut durch einen positiven Einfluss der Vitamine auf die diabetische Nephropathie erklärt werden. Die Unterschiede sind jedoch in der Gruppe B nicht statistisch signifikant. Der geringere

Rückgang der Albuminurie könnte auf den geringeren Schweregrad der Erkrankung in der Gruppe B (um 300 mg/24 h geringere Albuminausscheidung) zurückgeführt werden.

Ebenso verfehlte die Gruppe C trotz eines 31%igen Rückgangs der Albuminausscheidung mit  $p = 0,08$  ein signifikantes Niveau, allerdings in diesem Fall nur relativ knapp. In der Gruppe C lässt sich jedoch im Gegensatz zu den Gruppen A und B keine weitere Verbesserung durch den Vitamin-C-Zusatz erzielen. Auch in der Gruppe A ist nicht eindeutig, ob der Rückgang der Albuminausscheidung unter der Kombinationstherapie auf Vitamin C zurückzuführen ist. Schließlich liegt die Albuminausscheidung in der zweiten Studienphase mit Vitamin-E-Gabe nur 8% unter dem Rückgang nach Kombinationstherapie (60,3% vs. 52,3%).

Letztendlich kann damit nur eine größere und differenziertere Studie die gefundenen Tendenzen verifizieren und statistisch sichern.

## **5.7. Zukunftsperspektive**

Inzwischen zeigen mehr als 6.000 Studien, dass vor allem die Proteinkinase-C-Familie an nahezu allen für die Entstehung der diabetischen Folgeschäden bekannten pathologischen Vorgängen beteiligt sind. Dies gilt für den Insulin-, Glukose- und Lipidstoffwechsel. Auch die Genexpression und viele biochemische Reaktionen sind betroffen. Damit ist ein weiterer Einflussfaktor auf die Pathogenese der diabetischen Nephropathie in das Betrachtungsfeld der Diabetologen gerückt.

Doch auch hier weisen einige Studien darauf hin, dass Tokopherole in hoher Dosierung in diese Vorgänge positiv eingreifen können. So wird die DAG-Kinase durch Vitamin E aktiviert. Dadurch wird vermehrt DAG zu phosphoriger Säure verstoffwechselt. Als Folge davon bleibt eine Aktivierung einiger Proteinkinase-C-Isoformen aus. Als erste positive Auswirkung auf die diabetische Nephropathie konnte eine Verbesserung der retinalen Perfusion nachgewiesen werden (Thomkin, 2001; Idris et al., 2001).

Insgesamt unterstützen auch diese Ergebnisse die These, dass durch eine größer angelegte Studie die gefundenen positiven Tendenzen der Vitaminsupplementierung auf die diabetische Nephropathie statistisch gesichert werden könnten. Zwar ist mittlerweile mit der

Proteinkinase-C-Familie ein weiterer Aspekt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, doch hat sich Vitamin E auch auf diesem Gebiet als PKC-Inhibitor schon erfolgreich behaupten können (Forst, 2001).

Mit letzter Sicherheit kann nicht geklärt werden, ob die in dieser Studie gefundenen Effekte letztendlich zu einer verbesserten Mortalität oder einer langfristigen Verbesserung der diabetischen Folgeschäden führen. Dem widerspricht sicher die heart-protection-study (Ohne Autor, 2002), die nach 5-jähriger Vitaminsupplementierung ( $\beta$ -Karotin, Vitamin E + C) keinerlei Effekte auf die Mortalität noch die Inzidenz des Auftretens vaskulärer Erkrankungen oder Krebserkrankungen zeigte. Das gleiche Ergebnis zeigt auch die UKPDS-Studie, die anfänglich positive Einflüsse der Blutdrucksenkung auf die Albuminausscheidung fand. Diese verloren sich jedoch im Laufe der Jahre (Turner et al., 1998). Letztendlich scheint bisher kein Weg an einer Verbesserung des Glukosestoffwechsels für die langfristige Senkung der Mortalität vorbeizuführen. Vielleicht sollte deshalb auch bei allen Therapieansätzen die Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund stehen.

## 6. Zusammenfassung

Trotz vielfältiger Therapieoptionen des Diabetes mellitus, ist es bis heute nicht gelungen, einen Großteil der Diabetiker ausreichend einzustellen. Deshalb ist es nach wie vor wichtig, Therapieformen zu finden, die gut durchzuführen sind, wenig Nebenwirkungen haben und zusätzlich kostengünstig sind.

Die Datenlage für antioxidative Vitamine war vielversprechend, da sie auf vielen Ebenen diabetischer Stoffwechselstörungen einen positiven Effekt auszuüben schienen. Jedoch gab es bisher selten Studien, die synergistische Effekte von antioxidativen Vitaminen untersuchten. Ebenso gab es keine Studien, die den Einfluss auf die diabetischen Folgeschäden im Focus hatten. Die vorliegende Studie sollte anhand der diabetischen Nephropathie überprüfen, ob sich aus der Summe der bisherigen Daten auch ein klinischer Vorteil ergeben würde.

Insgesamt konnten 12 Diabetiker mit gesicherter Nephropathie in die Studie involviert werden. Daraus bildeten 8 Teilnehmer, die 4 Phasen der Studie durchliefen, die Gruppe B. Aus der Gruppe B nahmen 4 Patienten an der Phase 5 teil. Für die Gruppe C wurden von den 12 Diabetikern diejenigen mit der höchsten und niedrigsten Albuminausscheidung ausgeschlossen.

Um die in dieser Studie aufgestellte Hypothese zu beantworten, wurden neben der Albuminausscheidung als Parameter für die Schwere der diabetischen Nephropathie, das Fruktosamin, HbA<sub>1c</sub> und die Hb-AGE als Parameter der Stoffwechseleinstellung bestimmt. Die Dosierung der Vitamine mit 1.200 IE Vitamin E und 1.500 mg Vitamin C wurde früheren Studien angepasst.

Die geringe Probandenanzahl sowie die teilweise große interindividuelle Varianz der Messwerte und die daraus resultierende hohe Standardabweichung verhindern zum Teil den Nachweis einer statistischen Signifikanz. Trotzdem zeigt die Studie einen positiven Einfluss der antioxidativen Vitamine auf einige Parameter.

Ein positiver Einfluss auf Parameter der Bz-Kontrolle wird umso deutlicher, je länger der retrospektive Zeitraum des Messwertes ist. So wird die Höhe des Fruktosamins nicht, der HbA<sub>1c</sub> Wert bis zu 10% und die Menge der Hb-AGE bis zu 22% verbessert. Die



Verbesserungen der Hb-AGE-Spiegel waren bis auf eine Ausnahme signifikant und stellen damit eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit dar!

Obwohl die Albuminausscheidung unter der Vitaminsupplementierung um bis zu 60% abnahm, konnte die Verbesserung nicht statistisch gesichert werden. Jedoch bestätigte die Eliminierung von Ausreißern die Hypothese, dass die niedrige Probandenanzahl und der hohe Standardfehler einen statistischen Nachweis maskieren. So war die geringere Albuminausscheidung (30%) bei Vitamin-E-Gabe statistisch signifikant unter dem Basiswert, und die Kombinationstherapie verfehlte das Signifikanzniveau nur knapp ( $p = 0,08$ ). Beide Werte unterscheiden sich aber nur durch den größeren Standardfehler der Kombinationstherapie.

Sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B verbessert sich die Albuminausscheidung während der Vitamingabe und verschlechtert sich nach dem Absetzen. Die wiederholte Vitamin-E-Gabe führt in Gruppe A erneut zu einer Verbesserung der Albuminurie.

Insgesamt liegen damit einige Hinweise vor, um die Hypothese eines positiven Einflusses der antioxidativen Vitaminen E und C auf die diabetische Nephropathie zu stützen. Sicherlich kann aufgrund der genannten Limitationen erst mit einer größer und differenzierter angelegten Studie eine sichere Aussage getroffen werden.

Dort können dann auch zusätzliche in den Fokus gelangte Aspekte, allen voran die PKC-Familie, mitberücksichtigt werden. Dass dadurch die Mortalität der Diabetiker gesenkt werden kann, scheint zum jetzigen Zeitpunkt nach Erscheinen erster Langzeitstudien wie der heart-protection-study zweifelhaft. Jedoch blieb dieser Erfolg, der in der UKPDS-38-Studie als besonders wichtig eingestuften Blutdrucksenkung, schon verwehrt. Damit ist nach wie vor die Verbesserung der Stoffwechsellage der wichtigste Faktor zur Therapie des Diabetes mellitus.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Anderson JW, Blake JE, Turner J, Smith BM. Effects of soy protein on renal function and proteinuria in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr Suppl.* 1998; 68 (6): 1347S-53S
2. Aoki Y, Yanagisawa Y, Yazaki K, Oguchi H, Kiyosawa K, Furuta S. Protective effect of vitamin E supplementation on increased thermal stability of collagen in diabetic rats. *Diabetologia.* 1992; 35 (10): 913-6
3. Armstrong AM, Chestnutt JE, Gormley MJ, Young IS. The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21 (5): 719-26
4. Bakris GL, Weir MR, DeQuattro V, McMahon FG. Effects of an ACE inhibitor/calcium antagonist combination on proteinuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1998; 54 (4): 1283-9
5. Bauer JH. Modern antihypertensive treatment and the progression of renal disease. *J Hypertens Suppl.* 1998; 16 (5): S17-24
6. Baynes JW. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes.* 1991; 40 (4): 405-12
7. Bell DS, Alele J. Dealing with diabetic nephropathy. *Postgrad Med.* 1999; 105 (2): 83-7, 91-4

8. Berg TJ, Bangstad HJ, Torjesen PA, Østerby R, Bucala R, Hanssen KF. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1997; 46 (6): 661-5
9. Berg UB, Torbjørnsdotter TB, Jaremko G, Thalme B. Kidney morphological changes in relation to long-term renal function and metabolic control in adolescents with IDDM. *Diabetologia*. 1998; 41 (9): 1047-56
10. Bierenbaum ML, Noonan FJ, Machlin LJ, Machlin S, Stier A, Watson PB, Naso AM, Fleischmann AI. The Effect of Supplemental Vitamin E on Serum Parameters in Diabetics, Post Coronary and Normal Subjects. *Nutr Rep Int*. 1985; 31 (6), 1171-80
11. Bigley R, Wirth M, Layman D, Riddle M, Stankowa L. Interaction Between Glucose and Dehydroascorbate Transport in Human Neutrophils and Fibroblasts. *Diabetes*. 1983; 32 (6): 545-8
12. Bode AM. Metabolism of Vitamin C in Health and Disease. *Adv Pharmacol*. 1997; 38: 21-47
13. Böhles H. Radikalerkrankungen. *Z Geriatrie*. 1991; 4: 358-72
14. Bowry VW, Ingold KU, Stocker R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. *Biochem J*. 1992; 288 (Pt 2): 341-4
15. Bowry VW, Stocker R. Tocopherol-Mediated Peroxidation. The Prooxidant Effect of Vitamin E on the Radical-Initiated Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein. *J Am Chem Soc*. 1993; 115: 6029-44

16. Bravenboer B, Kapelle AC, Hamers FPT, van Buren T, Erkelens DW, Gispen WH. Potential use of glutathione for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia*. 1992; 35 (9): 813-7
17. Breyer JA. Medical management of nephropathy in type I diabetes mellitus: current recommendations. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6 (6): 1523-9
18. Brito PL, Fioretto P, Drummond K, Kim Y, Steffes MW, Basgen JM, Sisson-Ross S, Mauer M. Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1998; 53 (3): 754-61
19. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced Glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318 (20): 1315-21
20. Burne MJ, Panagiotopoulos S, Jerums G, Comper WD. Alterations in renal degradation of albumin in early experimental diabetes in the rat: a new factor in the mechanism of albuminuria. *Clin Sci (Colch)*. 1998; 95 (1): 67-72
21. Carella MJ, Gossain VV, Rovner DR. Early diabetic nephropathy. Emerging treatment options. *Arch Intern Med*. 1994; 154 (6): 625-30
22. Ceriello A. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med Suppl*. 1997; 14 (3): S45-9
23. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1997; 20 (2): 194-7

24. Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells inculture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*. 1996; 45 (4): 471-7
25. Ceriello A, Guigliano D, Quartraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E Reduction of Protein Glycosylation in Diabetes. *Diabetes Care*. 1991; 14 (1): 68-72
26. Ceriello A, Quatraro A, Guigliano D. Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycamia through oxidative stress. *Diabetologia*. 1993; 36 (3): 265-6
27. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet Med*. 1992; 9 (3): 297-9
28. Chen LH. An increase in vitamin E requirement induced by high supplementation ofvitamin C in rats. *Am J Clin Nutr*. 1981; 34 (6): 1036-41
29. Chen MS, Hutchinson ML, Pecoraro RE, Lee WYL, Labbe. Hyperglycemia-induced Intracellular Depletion of Ascorbic Acid in Human Mononuclear Leukocytes. *Diabetes*. 1983; 32(11): 1078-81
30. Choi KC, Lee SC, Kim SW, Kim NH, Lee JU, Kang YJ. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med*. 1999; 14 (1): 32-41
31. Comstock GW, Norkus EP, Hoffman SC, Xu MW, Helzlsouer KJ. Stability of ascorbic acid, carotenoids, retinol, and tocopherols in plasma stored at -70 degrees C for 4 years. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4 (5): 505-7

32. Copeland KR, Yatscoff RW, Thliveris JA, Penner SB, Mehta A. Effect of a low protein diet on the relationship of nonenzymatic glycation to altered renal structure and function in diabetes mellitus. *J Diabet Complications*. 1989; 3 (2): 113-9
33. Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer RK. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8 (9): 1405-14
34. Cunningham JJ, Ellis SL, McVeigh KL, Levine RE, Calles-Escandon. Reduced Mononuclear Ascorbic Acid Content in Adults With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Consuming Adequate Dietary Vitamin C. *Metabolism*. 1991; 40 (2): 146-9
35. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effect of Vitamin C on Glycosylation of Proteins. *Diabetes*. 1992; 41 (2): 167-73
36. Del Prete D, Anglani F, Ceol M, D'Angelo A, Forino M, Vianello D, Baggio B, Gambaro G. Molecular biology of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant Suppl*. 1998; 13 (8): 20-5
37. Diglas J, Bali C, Simon C, Strassegger-Bohm D, Irsigler K. Follow-up of albumin excretion during pregnancy and post partum in type 1 diabetic patients in comparison with health pregnant probands. *Acta Med Austriaca*. 1997; 24 (5): 170-4
38. Douillet C, Tabib A, Bost M, Accominotti M, Borson-Chazot F, Ciavatti M. A selenium supplement associated or not with vitamin E delays early renal lesions in experimental diabetes in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996; 211 (4): 323-31
39. Earle KA, Morocutti A, Viberti G. Permissive role of hypertension in the development of proteinuria and progression of renal disease in insulin-dependent diabetic patients. *J Hypertens*. 1997; 15 (2): 191-6

40. Elstner EF. Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. BI Wiss Ver, Mannheim, Wien, Zürich; 1990
41. Elstner EF. Sauerstoffabhängige Erkrankungen und Therapien. BI Wiss. Ver., Mannheim, Wien, Zürich; 1993
42. Eriksson J, Kohvakka A. Magnesium and ascorbic acid supplementation in diabetes mellitus. *Ann Nutr Metab.* 1995; 39 (4): 217-23
43. Forst T. New drugs for diabetes treatment. Fast acting insulin analogues. *Pharm Unserer Zeit.* 2001; 30 (2): 118-23
44. Friedrich E; Handbuch der Vitamine; Urban & Schwarzenberg, 1987
45. Garg MC, Singh KP, Bansal DD. Effect of vitamin C supplementation on oxidative stress in experimental diabetes. *Indian J Exp Biol.* 1997; 35 (3): 264-6
46. Gerstein HC, Bosch J, Pogue J, Taylor DW, Zinman B, Yusuf S. Rationale and design of a large study to evaluate the renal and cardiovascular effects of an ACE inhibitor and vitamin E in high-risk patients with diabetes. The MICRO-HOPE Study. Microalbuminuria, cardiovascular, and renal outcomes. Heart Outcomes Prevention Evaluation. *Diabetes Care.* 1996; 19 (11): 1225-8
47. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996; 19 (3): 257-67
48. Gulmann C, Rudberg S, Nyberg G, Østerby R. Enlargement of the juxtaglomerular apparatus in insulin-dependent diabetes mellitus patients with microalbuminuria. *Virchows Arch.* 1998; 433 (1): 63-7

49. Hansen HP, Christensen PK, Tauber-Lassen E, Klausen A, Jensen BR, Parving HH. Low-protein diet and kidney function in insulin-dependent diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1999; 55 (2): 621-8
50. Hansen HP, Tauber-Lassen E, Jensen BR, Parving HH. Effect of dietary protein restriction on prognosis with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2002; 62: 220-8
51. Hasslacher Ch. Diabetische Nephropathie – Früherkennung, Prävention und Behandlungsmöglichkeiten. *Diabetes Dialog.* 1988; 1-4
52. Hidaka S, Kaneko O, Shirai M, Kojima K, Igarashi Y, Oda K, Chimata M, Nakamura K, Nagase M. Do obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus aggravate exercise-induced microproteinuria?. *Clin Chim Acta.* 1998; 275 (2): 115-26
53. Hoffman BB, Sharma K, Ziyadeh FN. Potential role of TGF-beta in diabetic nephropathy. *Miner Electrolyte Metab.* 1998; 24 (2-3): 190-6
54. Hotta N. New concepts and insights on pathogenesis and treatment of diabetic complications: polyol pathway and its inhibition. *Nagoya J Med Sci.* 1997; 60 (3-4): 89-100
55. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. *Biochem J.* 1988; (256): 205-212
56. Hunt JV, Wolff SP. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic Res Commun.* 1991; 12-13 Pt 1: 115-123



57. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001; 44 (6): 659-73
58. Jacobs RA. Vitamin C in: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross CA, *Modern Nutrition in health and disease*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo; ninth edition. 1999: 467-84
59. Jain SK. Hyperglycemia Can Cause Membrane Lipid Peroxidation and Osmotic Fragility in Human Red Blood Cells. *J Biol Chem*. 1989; 264 (35): 21340-5
60. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes*. 1991; 40 (10): 1241-4
61. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes. *Diabetes*. 1989; 38 (12): 1539-43
62. Jain SK, McVie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T. Effect of modest vitamin E supplementation on blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients. *J Am Coll Nutr*. 1996; 15 (5): 458-61
63. Jain SK, Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22 (4): 593-6
64. Jones PJH, Kubow S. Lipids, Sterols, and Their Metabolites in: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross CA. *Modern Nutrition in health and disease*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo. 1999; ninth edition: 67-94

65. Kähler W, Kuklinski B, Rühlmann C, Plötz C. Diabetes mellitus - eine mit Freien Radikalen assoziierte Erkrankung. *Z Gesamte Inn Med.* 1993; 48: 223-32
66. Kaji H, Kurasaki M, Ito K, Saito T, Saito K, Niioka T, Kojima Y, Ohsaki Y, Ide H, Isuji M, Kondo T, Kawakami Y. Increased Lipoperoxide Value and Glutathione Peroxidase Activity in Blood Plasma of Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetic Women. *Klin Wochenschr.* 1985; 63(16): 765-8
67. Kasiske BL, Lakatua JD, Ma JZ, Louis TA. A meta-analysis of the effects of dietary protein restriction on the rate of decline in renal function. *Am J Kidney Dis.* 1998; 31 (6): 954-61
68. Kasper H. *Ernährungsmedizin und Diätetik*, Urban & Fischer Verlag. 2000; 42-43
69. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13 (11): 2829-32
70. Koya D, Haneda M, Kikkawa R, King GL. d -alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunctions in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway. *Biofactors.* 1998; 7 (1-2): 69-76
71. Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8 (3): 426-35
72. Krone CA, Ely JTA. Vitamin C and Glycohemoglobin Revisited. *Clin Chem.* 2001; 47 (1): 148

73. Kunisaki M, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Vitamin E Restores Reduced Prostacyclin Synthesis in Aortic Endothelial Cells Cultured With a High Concentration of Glucose. *Metabolism*. 1992; 41 (6): 613-21
74. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*. 1999; 13 (1): 23-30
75. Leinonen J, Rantalaiho V, Lehtimäki T, Koivula T, Wirta O, Pasternack A, Alho H. The association between the total antioxidant potential of plasma and the presence of coronary heart disease and renal dysfunction in patients with NIDDM. *Free Radic Res*. 1998; 29 (4): 273-81
76. Luft D, Eggstein M; Kohlenhydratstoffwechsel. in: Kaufmann W, Löhr GW, *Pathophysiologie*, Georg Thieme Verlag. 1992: 82-6
77. Mahoney JR, Graf E. Role of Alpha-Tocopherol, Ascorbic Acid, Citric Acid and EDTA as Oxidants in Model Systems. *J Food Sci*. 1986; 51 (5): 1293-6
78. Maiorino M, Zamburlini A, Roveri A, Ursini F. Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation. *FEBS Letter*. 1993; 330 (2): 174-6
79. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical Detection of Advanced Glycosylation End Products *in Vivo*. *J Biol Chem*. 1992; 267 (8): 5133-8
80. Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R. Hemoglobin-AGE: A Circulating Marker of Advanced Glycosylation. *Science*. 1992; 258 (5082): 651-3

81. Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, La Marca C, Giunta R, Lucarelli C, Paolisso G, Ceriello A, Giugliano D. Glutathione reverses systemic hemodynamic changes induced by acute hyperglycemia in healthy subjects. *Am J Physiol.* 1995; 268 (6 Pt 1): E1167-73
82. McAuliffe AV, Fisher EJ, McLennan SV, Yue DK, Turtle JR. High glucose inhibits effect of ascorbic acid on [35S] sulphate incorporation in mesangial cell and matrix proteoglycan. *Diab Res Clin Pract.* 1997; 37 (2): 101-8
83. McCarty MF. A central role for protein kinase C overactivity in diabetic glomerulosclerosis: implications for prevention with antioxidants, fish oil, and ACE inhibitors. *Med Hypotheses.* 1998; 50 (2): 155-65
84. Mekinova D, Chorvathova V, Volkovova K, Staruchova M, Grancicova E, Klvanova J, Ondreicka R. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung.* 1995; 39 (4): 257-61
85. Michels LD, Davidman M, Keane WF. Glomerular permeability to neutral and anionic dextrans in experimental Diabetes. *Kidney Int.* 1982; 21 (5): 699-705
86. Mimran A, Ribstein J. Diabetic nephropathy in normotensive patients. *J Hypertens Suppl.* 1990; 8 (1): S53-9
87. Mukai K, Sawada K, Kohno Y, Terao J. Kinetic Study of the Prooxidant effect of Tocopherol. Hydrogen Abstraction from Lipid Hydroperoxides by Tocopheroxyls in Solution. *Lipids.* 1993; 28 (8): 747-52
88. Nagaraj RH; Monnier VM. Protein modification by the degradation products of ascorbate: formation of a novel pyrrole from Maillard reaction of L-threose with proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1253 (1): 75-84

89. Ng LL, Ngkeekwong FC, Quinn PA, Davies JE. Uptake mechanisms for ascorbate and dehydroascorbate in lymphoblasts from diabetic nephropathy and hypertensive patients. *Diabetologia*. 1998; 41 (4): 435-42
90. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr*. 1991; 54 (6 Suppl): 1119S-24S
91. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*. 1995; 44 (9): 1054-8
92. O'Brien SF, Watts GF, Powrie JK, Shaw KM, Miller NJ. Lipids, lipoproteins, antioxidants and glomerular and tubular dysfunction in type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996; 32 (1-2): 81-90
93. Ocké MC, Schrijver J, Obermann-de Boer GL, Bloemberg BP, Haenen GR, Kromhout D. Stability of blood (pro)vitamins during four years of storage at -20 degrees C: consequences for epidemiologic research. *J Clin Epidemiol*. 1995; 48 (8): 1077-85
94. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with NIDDM. *Diab Res Clin Pract*. 1995; 28 (2): 103-17
95. Ohne Autor. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002; 360: 23-33

96. Ohne Autor. THE EFFECT OF INTENSIVE TREATMENT OF DIABETES ON THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF LONG-TERM COMPLICATIONS IN INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS. *N Engl J Med.* 1993; 329 (14): 977-86
97. Oldendoerp J, Spitznas M. Moderne Diagnostik und Therapie der diabetischen Retinopathie. *Diabetes Dialog.* 1987; 10: 1-7
98. Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K, Tsukada Y. Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diab Res Clin Pract.* 1998; 41 (2): 131-7
99. Østerby R. Glomerular structural changes in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: causes, consequences, and prevention. *Diabetologia.* 1992; 35 (9): 803-12
100. Østerby R, Schmitz A, Nyberg G, Asplund J. Renal structural changes in insulin-dependent diabetic patients with albuminuria. Comparison of cases with onset of albuminuria after short or long duration. *APMIS.* 1998; 106 (3): 361-70
101. Ozden I, Deniz G, Tasali E, Ulusarac A, Altug T, Buyukdevrim S. The Effect of Vitamin E on Glycosylated Hemoglobin Levels in Diabetic Rats: a Preliminary Report. *Diab Res.* 1989; 12 (3): 123-4
102. Packer L; Interactions among Antioxidants in Health and Disease: Vitamin E and its redox cycle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 200 (2): 271-6
103. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1993; 36 (11): 1212-3

104. Palmer AM, Thomas CR, Gopaul N, Dhir S, Anggard EE, Poston L, Tribe RM. Dietary antioxidant supplementation reduces lipid peroxidation but impairs vascular function in small mesenteric arteries of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetologia*. 1998; 41 (2): 148-56
105. Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Daily Vitamin E Supplements Improve Metabolic Control But Not Insulin Secretion in Elderly Type II Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 1993; 16 (11): 1433-7
106. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. Pharmacologic Doses Of Vitamin E Improve Insulin Action In Healthy Subjects And Non-Insulin-Dependent Diabetic Patients. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57 (5): 650-6
107. Parving HH. Benefits and cost of antihypertensive treatment in incipient and overt diabetic nephropathy. *J Hypertens Suppl*. 1998; 16 (1): S99-101
108. Pijls LTJ, de Vries H, Donker AJM, van Eijk JTM. The effect of protein restriction on glomerular filtration rate and albuminuria: a randomized trial with 28 months of follow up. *Diabetologia*. 1999; 41: A46
109. Pritchard Jr. KA, Patel SJ, Karpen CW, Newman HAI, Panganamala RV. Triglyceride-lowering Effect of Dietary vitamin E in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Diabetes*. 1986; 35 (3): 278-81
110. Rahbar S, Yerneni KK, Scott S, Gonzales N, Lalezari J. Novel inhibitors of advanced glycation end products (part II). *Mol Cell Biol Res Commun*. 2000; 3 (6): 360-6
111. Rao G, Pichappa CV. Lipid Peroxidation in Various Organs During Diabetes Mellitus. Effect of Megadoses of Vitamin A and E. *Med Sci Res*. 1992; 20 (7): 263-4

112. Reaven PD, Herold DA, Barnett J, Edelman S. Effects of Vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM. *Diabetes Care*. 1995; 18 (6): 807-16
113. Rösen P. Oxidativer Stress als Ursache der diabetischen Mikroangiopathie?. *Diabetes und Stoffwechsel*. 1994; 3: 112
114. Rösen P. Vitamin E und Diabetes in: Schmidt KH, Wildmeister W. Vitamin E in der modernen Medizin, Band 8 der Schriftenreihe der Nordrheinischen Akademie für ärztliche Fort- und Weiterbildung, MKM Verlagsgesellschaft, Lenggries/Obb.; 1993: 77-86
115. Rösen P, Oestreich R, Tschöpe D. Vitamin E and Diabetes. *Fat Sci Technol*. 1991; 93 (11): 425-31
116. Ruggerenti P, Gambara V, Perna A, Bertani T, Remuzzi G. The nephropathy of non-insulin-dependent diabetes: predictors of outcome relative to diverse patterns of renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9 (12): 2336-43
117. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid Peroxide Level in Plasma of Diabetic Patients. *Biochem Med*. 1979; 21 (1): 104-7
118. Schorah CJ, Bishop N, Wales JK, Hansbro PM, Habibzadeh N. Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res*. 1988; 58 (3): 312-8
119. Sell DR, Lapolla A, Odetti P, Fogarty J, Monnier VM. Pentosidine Formation in Skin Correlates With Severity of Complications in Individuals With Long-Standing IDDM. *Diabetes*. 1992; 41 (10): 1286-92



120. Sinclair AJ, Girling AJ, Gray L, Lunecf J, Barnett AH. An Investigation of the Relationship between Free Radical Activity and Vitamin C Metabolism in Elderly Diabetic Subjects with Retinopathy. *Gerontology*. 1992; 38 (5): 268-74
121. Singh AK, Mo W, Dunea G, Arruda JA. Effect of glycated proteins on the matrix of glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9 (5): 802-10
122. Stolba P, Hátle K, Krnáková A, Streda M, Stárka L. effects of ascorbic acid on non-enzymatic glycation of serum proteins in vitro and in vivo. *Diabetologia*. 1987; 30: 585 A
123. Stolba P, Streda M, Vondra K, Hátle K, Adam M. Ascorbic acid inhibits nonenzymatic glycation of collagen type I, II, IV, V, IX, XI in vitro and renal basement membrane in vivo. *Diabetologia*. 1988; 31: 547 A
124. Sun F, Iwaguchi K, Shudo R, Nagaki Y, Tanaka K, Ikeda K, Tokumaru S, Kojo S. Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Colch)*. 1999; 96 (2): 185-90
125. Tada H, Ishii H, Isogai S. Protective effect of D-alpha-tocopherol on the function of human mesangial cells exposed to high glucose concentrations. *Metabolism*. 1997; 46 (7): 779-84
126. Taniwaki H, Nishizawa Y, Kawagishi T, Ishimura E, Emoto M, Okamura T, Okuno Y, Morii H. Decrease in glomerular filtration rate in Japanese patients with type 2 diabetes is linked to atherosclerosis. *Diabetes Care*. 1998; 21 (11): 1848-55
127. Terao J, Matsushita S. The Peroxidizing Effect of  $\alpha$ -Tocopherol on Autoxidation of Methyl linoleate in Bulk Phase. *Lipids*. 1986; 21 (4): 255-60

128. Thomas JA. Oxidative Stress, Oxidant Defense, and Dietary Constituents in: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross CA. Modern Nutrition in health and disease. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo; ninth edition. 1999: 751-760
129. Tomino Y, Wang LN, Fukui M, Yaguchi Y, Koide H. Glomerular nonenzymatic glycosylation and lipid peroxide are increased in the early phase of streptozotocin-induced diabetic rats prior to major histopathologic alterations. *Nephron*. 1991; 59 (4): 632-6
130. Tomkin GH. Diabetic vascular disease and the rising star of Protein Kinase C. *Diabetologia*. 2001; 44 (6):657-8
131. Traber MG. Regulation of Human Plasma Vitamin E. *Adv Pharmacol*. 1997; 38: 49-63
132. Traber MG. Vitamin E. in: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross CA. Modern Nutrition in health and disease. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo. ninth edition. 1999; 347-62
133. Trachtman H, Futterweit S, Crimmins DL. High glucose inhibits nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8 (8): 1276-82
134. Turner R, Holman R, Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, Matthews D, Neil A, McElroy H, Kohner E, Fox C, Hadden D, Wright D. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ*. 1998; 317: 703-13

135. van der Pijl JW, Daha MR, van den Born J, Verhagen NA, Lemkes HH, Bucala R, Berden JH, Zwinderman AH, Bruijn JA, van Es LA, van der Woude FJ. Extracellular matrix in human diabetic nephropathy: reduced expression of heparan sulphate in skin basement membrane. *Diabetologia*. 1998; 41 (7): 791-8
136. Walser M, Hill S. Can renal replacement be deferred by a supplemented very low protein diet?. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10 (1): 110-6
137. Weir MR, Dworkin LD. Antihypertensive drugs, dietary salt, and renal protection: how low should you go and with which therapy?. *Am J Kidney Dis*. 1998; 32 (1): 1-22
138. Winegard AI. Does a Common Mechanism Induce the Diverse Complications of Diabetes?. *Diabetes*. 1987; 36: 396-406
139. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. *Biochem J*. 1987; 245: 243-250
140. Young IS, Torney JJ, Trimble ER. The Effect Of Ascorbate Supplementation On Oxidative Stress In The Streptozotocin Diabetic Rat. *Free Radical Biol Med*. 1992; r.1 (13): 41-46
141. Yue DK, McLennan S, McGill M, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Turtle JR. Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control: differences between diabetic patients and diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990; 9 (3): 239-44
142. Zmolauski-Tucker MJ, Springate JE, Van Liew JB, Noble B, Feld LG. Glomerular function in spontaneously diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 199 (1): 59-64

143. Zeller K, Whittaker E, Sullivan L, Raskin P, Jacobson HR. Effect of restricting dietary protein on the progression of renal failure in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1991; 324: 78-84

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Laube für die Bereitstellung des Themas, die intensive Betreuung, die Literaturdurchsicht, die Bereitschaft zu vielen konstruktiven Ratschlägen und die unendliche Geduld bedanken.

Frau Prof. Neuhäuser-Berthold gilt mein Dank für die Bereitschaft der Übernahme der zweiten Betreuung sowie der Möglichkeit, an Ihrem Institut zu arbeiten und benötigte Untersuchungen durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt den vielen beteiligten Damen und Herren, sowohl der Poliklinik als auch dem Institut für Ernährungswissenschaft für die Hilfe zur Durchführung dieser Arbeit. Hier sind aus der Poliklinik zu nennen: Frau Willems und Frau Häuser, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, die Abteilung von Herrn Prof. Bretzel und Frau Dr. Weiß für die Bereitstellung von Patientendaten sowie Frau Dr. Liersch für die fachliche Unterstützung. Im Institut für Ernährungswissenschaft sind zu erwähnen: Herr Farnung und Fr. Brenner für die Unterstützung bei den Messungen, allen Kollegen und Kolleginnen für den regen Gedankenaustausch sowie Sabine Verwied-Jorky für die moralische Unterstützung.

Für die Unterstützung bei der Auswahl der relevanten statistischen Verfahren gilt Herrn Dr. Manfred Hollenhorst aus der Abteilung Anwendung und Dokumentation im Hochschulrechenzentrum an der Justus-Liebig-Universität Gießen mein besonderer Dank.

An dieser Stelle sei auch Herrn Dr. Richard Bucala vom Picower Institute Manhasset New York USA gedankt, der sich bereit erklärte, die Bestimmung der Hb-AGE-Werte durchzuführen.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben und mich die ganzen Jahre über immer begleitet haben.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Frau Aline bedanken, deren liebevolle Unterstützung nicht in Worte gefasst werden kann.